



**Naturalis**

Repositorio Institucional  
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



# **Triatoma virus : Estudio de la diversidad en Triatominos de Argentina**

**Susevich, María Laura**

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Echeverría, María Gabriela

Co-dirección: Marti, Gerardo Aníbal

Facultad de Ciencias Naturales y Museo  
2012

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20140311001326>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



**Naturalis**

Repositorio Institucional  
FCNyM - UNLP

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

**TRIATOMA VIRUS:  
ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD  
EN TRIATOMINOS DE ARGENTINA**

MARIA LAURA SUSEVICH

Trabajo de Tesis Doctoral

Directora  
María Gabriela Echeverría

Codirector  
Gerardo Aníbal Marti

2012



---

A mamá por ser mi sostén incondicional, por la alegría heredada, por enseñarme a valorar las pequeñas cosas y hacerme sentir en paz.... porque tus palabras son siempre las que necesito escuchar.....

A papá por cuidarme y contenerme, por estar atento a todo.....por enseñarme con tu ejemplo todos los días.....y por inculcarme a ser sobre todas las cosas, una buena persona.....

A mis dos hermanos, Juan Pablo y Agustín, por su amistad y constante cariño:

A Juan por enseñarme a que todo es posible y con perseverancia las metas se pueden lograr.....

A Agus, porque a pesar de ser el más chiquito, me estás enseñando a cómo afrontar las dificultades que aparecen en nuestro camino y hoy más que nunca me estás dando una lección de vida....

A Ángelo por alegrar mis días.....

A Sergio por apoyarme y acompañarme en absolutamente todo lo que hace a mi vida profesional y en lo personal porque me enseñaste a ver las cosas de otra manera.....porque con tu ejemplo de vida me enseñás todos los días.....

Porque gracias a ellos pude hacer posible este camino recorrido.

Gracias a los que estuvieron y están.....un gracias infinito con el corazón.

---

**GRACIAS.....**

- A mi directora de Tesis, María Gabriela Echeverría (Gaby), por haberme brindado la dirección y acercarme a un mundo que era desconocido para mí: el de los “virus”, a través de su dedicación y consejos, brindándome las herramientas necesarias para transcurrir y concluir esta etapa en mi formación profesional. GRACIAS por todo Gaby!!
- A mi co-director, Gerardo Marti, porque nunca pensé que desde aquel primer día que nos conocimos en Parasitología General, hace tantos años, terminarías siendo mi director: GRACIAS.....porque me enseñaste a tomarme las cosas de una manera distinta....porque a través de tu espíritu de trabajo, tu optimismo de todos los días, tu apoyo y continuo estímulo fuiste fundamental en esta etapa de mi vida, no sólo profesional.
- Al Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) y muy especialmente a su directora Dra. Alda González por brindarme el espacio y la infraestructura donde desarrollar esta investigación. Gracias Tita por el apoyo incondicional!!
- A la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) y su directora la Dra. Teresa González por haberme permitido la realización de las técnicas virológicas y el uso del moderno equipamiento con que cuenta la cátedra.
- A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de las becas que me permitieron realizar esta tesis doctoral.
- A la Dra. Silvia Catalá y al Dr. David Gorla, por haber financiado parte de los muestreos en la provincia de La Rioja durante el período de mi tesis (PICT 2006-00878).



- Este trabajo de tesis fue financiado parcialmente por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), PICT N°2005-32618 y PICT N°2008-0035.
- A los miembros de la RED-TrV–CyTED (209RT0364) por haber financiado parte de mi especialización realizada en el exterior. En especial a Diego, por haber confiado en mí.
- A mí querida “casa”: La facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP) que me formó.
- A los integrantes de la Cátedra de Zoología Invertebrados I.
- A los integrantes del proyecto de Extensión “¿De qué hablamos cuando hablamos de Chagas?” (UNLP), en especial a Mari. y Ceci
- Al Dr. Patricio Diosque de la Unidad de Epidemiología Molecular, Instituto de Patología Experimental, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta, CONICET. Salta, Argentina y a los biólogos Delmi Canale y el Raúl Stariolo del Centro de Referencia de Vectores, Coordinación Nacional de Control de Vectores. Santa María de Punilla, Córdoba, Argentina, por el envío de material.
- A mis compañeros de “viro”: Ceci, Marce; Mari, Adri, Vivi, Herchu, Marco, Sabri, Nadin, Javi, Mumi, Verocha, Ale, Fito, Colo, Sole y Ger: por haberme ayudado en absolutamente TODO y haber compartido de diferentes maneras y en distintos momentos mis días en el trabajo. Por los consejos recibidos en diferentes oportunidades. Gracias por la amistad y el cariño brindado.
- A Ger por tantas veces socorrerme con las figuras, fotos y gráficos de la tesis!!! (Gracias por tanta paciencia!).
- A Sole, simplemente por haber estado ahí desde el primer día, al pie del cañón!!!!
- A Fitachuli: amigo y compañero incondicional.....llegar y tomar una mate con vos....y siempre esperarme con una sonrisa!

- A mis compañeros del CEPAVE: Vic, Gustavo, Evan, Agustín, Pau y Sole, por colaborar de una u otra manera en la realización de esta tesis en un clima de amistad, permanente colaboración y amplia generosidad.
- A mi querido compañero y amigo Agustín, por ayudarme SIEMPRE cuando te necesité.....por las charlas, por los mates, simplemente Gracias!!!!
- A toda la gente querida del CEPAVE: a Marcelo, Gastón, especialmente a Enrique y a mi queridísimo Aníbal; por ayudarme con los papeles, impresiones y problemas informáticos, pero por sobre todo por el buen humor de todos los días.
- A mis compañeros de viajes de campaña: Cailo, Gerardo y muy especialmente a “Pini”, por haber hecho de esos viajes experiencias sumamente gratificantes que recordaré siempre....porque a pesar del calor y el arduo trabajo todo era motivo de risas!!!!
- A Cin, Maruja, Nica, Verocha y Meriló por el aguante y momentos compartidos.
- A Juliana: gracias por el apoyo de este último tiempo!!!!!!
- A Roxi, por haberme ayudado con el diseño y armado de las láminas de la tesis, por las ideas.....Gracias Ro!!!!
- A Lore por la revisión minuciosa de la bibliografía. Porque una vez más...estuviste ahí!!!!
- A Julita, Roxi y Lore: por haberme escuchado y aconsejado. Por tranquilizarme en mis momentos de ansiedad. Gracias Julita por orientarme, gracias Lore por enseñarme con tanto entusiasmo y Ro por el tiempo desinteresado dedicado a mi....Gracias por todo el apoyo y amistad brindados.
- A mis “amigos platenses” ....los que me abrieron las puertas de su casa y su corazón cuando me tenía que quedar en La Plata porque al otro día

tenía que venir temprano o cancelaban algún tren.....Gracias Lore, Julita y Kabe!!!!!! Gracias por ser tan buenos amigos!!

- A mis ex compañeros y HOY AMIGOS incondicionales: Chechu, Juli, Ceci C., Lore, Lucas, Mariela, Marce, Julita, Sole, Cailo y Guille por el cariño y amistad desde hace tantos años.
- A la Dra. Graciela Navone (Gra) por haberme iniciado en este hermoso camino: por haber estado SIEMPRE. Por la palabra justa en el momento preciso. Por ser mi guía no solo en lo profesional, sino también en mi vida personal. Gracias por haber sido esa “mamá” en los momentos que más te necesite.....porque tuviste demasiado que ver en que hoy sea lo que soy y haya llegado hasta acá.... Gracias por ese cariño infinito....
- A Cristina y Andrea por el apoyo en esta última etapa y el cariño brindado.
- A mis amigos de toda la vida: Nico, Marisya, Elvio, Naty, Pita, Ana, Berni, Lore, Raúl, Vero y Ale....simplemente por ser mis queridos amigos de la vida.
- A mi amiga “del alma” Marisya.....porque estuviste, estás y estarás compartiendo cada momento importante de mi vida. Gracias por el aguante, por ser simplemente la hermana que no tuve.
- A mis abuelos, hermanos, a Sergio y Ángelo y a papá y mamá, por haberme acompañado y ayudado incondicionalmente en esta etapa. Gracias por tanto amor.....

Muy especialmente quiero agradecer a todas las familias de La Rioja y en especial de la provincia de Chaco, que amable y desinteresadamente ayudaron en la realización de este trabajo.

RESUMEN	iii
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO I	
1.1-INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1.1- TRIPANOSOMIASIS AMERICANA	1
1.1.2- PARÁSITO Y VECTOR	5
1.1.3- VIRUS: CARACTERÍSTICAS GENERALES	9
1.1.4- FAMILIA DICISTROVIRIDAE	10
1.1.5- TRIATOMA VIRUS (TrV): CARACTERÍSTICAS, TRANSMISIÓN Y CONTROL BIOLÓGICO	12
1.2- HIPÓTESIS	20
1.3- OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	20
1.4- RELEVANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	22
CAPÍTULO II: DIVERSIDAD DE TrV EN TRIATOMINOS DE ARGENTINA	
2.1- ANTECEDENTES	24
2.2- MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.2.1- TRABAJO DE CAMPO	24
2.2.1.1- COLECTA DE TRIATOMINOS SILVESTRES	25
ÁREAS DE MUESTREO	26
MÉTODOS DE CAPTURA	29
2.2.1.2- COLECTA DE TRIATOMINOS EN DOMICILIO Y PERIDOMICILIO	34
ÁREAS DE MUESTREO	36
MÉTODOS DE CAPTURA	37
TRIAOMINOS COLECTADOS PREVIAMENTE	39
2.2.1.3- MANTENIMIENTO EN EL LABORATORIO DE LOS TRIATOMINOS	40
2.2.2- TRABAJO DE LABORATORIO	41
2.2.2.1- METODOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y EXTRACCIÓN DE MATERIA FECAL DE LOS TRIATOMINOS	41
2.2.2.2- METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE TrV	42
ELABORACIÓN DEL CONTROL POSITIVO	42
DETECCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN	46
EXTRACCIÓN DE ARN	46
TÉCNICA DE RT- PCR	46
DISEÑO DE PRIMERS	48
PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN	49
SECUENCIACIÓN, ALINEAMIENTO Y ARBOLES FILOGENÉTICOS	53
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)	54
2.3- RESULTADOS	54
2.3.1- TRIATOMINOS SILVESTRES	55
2.3.2- TRIATOMINOS EN DOMICILIO Y PERIDOMICILIO	56
2.3.3- CONTROL POSITIVO DE TrV	63
2.3.4- DETECCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN	64
TÉCNICA DE RT- PCR	64
PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN	65

SECUENCIACIÓN, ALINEAMIENTO Y ARBOLES FILOGENÉTICOS	66
2.3.5- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)	71
2.4- DISCUSIÓN	72
ANEXO TABLAS	75
ANEXO SECUENCIAS	82
<b>CAPÍTULO III: REPLICACIÓN DE TrV EN CULTIVOS CELULARES</b>	
3.1-ANTECEDENTES	109
3.2- MATERIALES Y MÉTODOS	111
3.2.1- REPLICACIÓN DE TrV EN CÉLULAS DE INSECTO	111
PROCESO DE TRANSFECCIÓN	111
ELECTROPORACIÓN	113
INOCULACIÓN CON TRIPSINA	114
INOCULACIÓN DIRECTA: VIRUS PURIFICADO	114
3.2.2- OBTENCIÓN DE CULTIVO PRIMARIO DE <i>T. INFESTANS</i> LIBRE DE TrV	115
3.2.2.1- INSTALACION Y MANTENIMIENTO DE COLONIAS DE <i>T. INFESTANS</i>	115
3.2.2.2- SUSTRATOS PARA LA REALIZACION DE CULTIVO PRIMARIO: EMBRIONES Y ADULTOS	116
3.2.3- INOCULACIÓN DE HUEVOS EMBRIONADOS	119
3.2.4-TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN	119
SDS-PAGE	119
WESTERN BLOT (WB)	120
TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	121
DETECCIÓN DIRECTA POR RT-PCR	122
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)	122
TÉCNICA DE HEMAGLUTINACIÓN (HA)	123
3.3- RESULTADOS	124
3.3.1- REPLICACIÓN TrV EN CÉLULAS DE INSECTO Y CULTIVO PRIMARIO	124
3.3.2- INOCULACIÓN DE HUEVOS EMBRIONADOS	125
3.3.3- TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN	126
3.4- DISCUSIÓN	130
<b>CAPÍTULO IV</b>	
4.1- CONCLUSIONES FINALES	134
4.2- PERSPECTIVAS	135
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137



## RESUMEN

La Tripanosomiasis americana es el problema sanitario más relevante de la Argentina, afectando cerca de 1,6 millones de personas. La Organización Mundial de la Salud considera a la enfermedad de Chagas como uno de los mayores flagelos de América Latina: unas 18 millones de personas sufren sus consecuencias y 120 millones están en riesgo de infección. Si bien esta enfermedad se distribuye principalmente en América Latina, en las últimas décadas se ha observado con mayor frecuencia en los Estados Unidos, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental.

Hasta hoy, el control de esta enfermedad, se basa exclusivamente en insecticidas que acarrearán múltiples problemas en cuanto a su incorrecta aplicación y baja selectividad, debido a que eliminan tanto enemigos naturales de los triatomíneos como otras especies benéficas para el hombre, produciendo un gran deterioro en el medio ambiente, provocando todo esto que los insectos sean cada vez más resistentes a los insecticidas aplicados.

La introducción o el incremento de enemigos naturales en poblaciones naturales de las principales especies transmisoras de Chagas, puede lograr con el tiempo la reducción del número de vectores a niveles que aseguren la interrupción de la transmisión del parásito en la población susceptible. Cabe destacar que los aspectos negativos en las campañas de rociado y la perspectiva que esas dificultades se agraven, ha motivado a que la búsqueda de nuevos métodos de control de triatomíneos de domicilio y peridomicilio haya sido identificada como un área prioritaria de investigación por la Organización Mundial de la Salud.

El Triatoma virus (TrV) es el único virus entomopatógeno identificado en triatomíneos hasta el momento. Existen observaciones que sustentarían el uso de TrV como control biológico. Muscio en 1997,

registró porcentajes superiores a 90% de mortalidad en el laboratorio en estados ninfales de *T. infestans* infectados con TrV. Además, Rozas-Dennis y Cazzaniga en el 2000, observaron que la infección con TrV reduce la longevidad y la fecundidad de las hembras adultas, y que las ninfas infectadas muestran parálisis en las patas y dificultad para desprenderse de la exuvia.

De acuerdo al Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV), TrV pertenece a la familia *Dicistroviridae* cuya especie tipo es el virus de la parálisis del grillo, con un único género: Cripavirus. Es un virus ARN de hebra simple y sentido positivo, con una longitud de 9.010 bases y una masa molecular teórica de 2.886,4 KDa. La composición de los viriones de TrV es 35% de ARN y 65% de proteínas. El genoma posee dos marcos abiertos de lectura denominados ORF1 y ORF2 que codifican las proteínas no estructurales y de la cápside respectivamente; separados por una región intergénica (IGR).

De acuerdo a los estudios realizados hasta el momento, TrV puede transmitirse principalmente por vía horizontal, mediante la ruta fecal-oral, como así también por una vía vertical (transovárica). Su distribución en la naturaleza se restringe solamente a *T. infestans* y *T. sordida*. Hasta el momento no se conocen estudios inherentes a la búsqueda de TrV en Latinoamérica: al presente solo se ha encontrado en Argentina.

El objetivo central de este trabajo fue, por un lado estudiar la diversidad de TrV en triatominos de nuestro país; y obtener un sistema para la replicación de TrV *in vitro*. Así, se analizaron triatominos de 10 provincias argentinas desde el 2008 hasta el 2011, resultando un total de 1632 ejemplares pertenecientes a 10 especies de domicilio, peridomicilio y ambiente silvestre: *T. infestans*, *T. guasayana*, *T. delpontei*, *T. breyeri*, *T. eraturysiforme*, *T. sordida*, *T. platensis*, *T. garciabesi*, *Panstrongylus guentheri* y *Psammolestes coreodes*. Las especies anteriormente mencionadas fueron capturadas en viajes de

campana, obtenidas del material conservado en la colección de nuestro laboratorio o enviadas de otros centros de referencia. A todos los insectos se les extrajo la materia fecal para luego extraerle ARN y finalmente analizarlas mediante RT-PCR. Los resultados positivos resultantes de la RT-PCR fueron 29. Estos productos resultantes se purificaron, cuantificaron y se enviaron a secuenciar. El análisis de las muestras secuenciadas no mostraron variabilidad genómica significativa. Esto se vio reflejado tanto a nivel específico, como de hábitat y distribución geográfica de los triatominos.

Contar con líneas o cultivos celulares sensibles a la infección con TrV podría traer grandes ventajas. Permitir aislar, caracterizar y estudiar en profundidad la biología del virus nos permitiría obtener masa viral, siendo una herramienta fundamental para su posible uso como agente de control biológico. Si bien, no se conocen líneas celulares susceptibles a TrV, se intentó su replicación en líneas de dípteros y lepidópteros. Se desconoce además, si el virus producirá efecto citopático visible en las células.

Con respecto a este otro gran objetivo general, se intentó la replicación de TrV en cultivos celulares. Por un lado, en líneas celulares de insecto, por medio de distintos métodos: transfección, electroporación, inoculación con tripsina y con virus purificado. Por otro lado se intentó obtener cultivo primario de vinchucas sanas. Para esto se utilizaron triatominos de la colonia de nuestro laboratorio. Los sustratos para la realización del cultivo primario fueron embriones y adultos (con y sin tripsina y explantos); además se inocularon huevos embrionados. Para todos los métodos y ensayos descriptos anteriormente, se utilizaron técnicas de SDS-PAGE, Western Blot (WB), Inmunofluorescencia indirecta (IFI) o bien RT-PCR para confirmar la presencia del TrV en las células. Para evaluar el líquido alantoideo se utilizó la técnica de Hemaglutinación (HA). No fue posible la replicación *in vitro* de TrV en líneas celulares de dípteros (C6/36) y lepidópteros

(SF9, SF21, HighFive). Tampoco fue posible obtener un clon celular partiendo de tejidos adultos o embrionarios de vinchucas sanas. En cuanto a la presencia de virus en líquido alantoideo por HA, en ningún caso se obtuvo resultado positivo, ni tampoco utilizando sobrenadantes supuestamente infectados. Sin embargo el virus TrV purificado utilizado como control, aglutinó los glóbulos rojos de pollo. En las pruebas complementarias de Microscopia electrónica, SDS-PAGE, WB, IFI, RT-PCR tampoco obtuvimos resultados satisfactorios.

Este trabajo de tesis, representa uno de los estudios más amplios realizado hasta el presente en TrV de triatomíneos en Argentina.

El registro de este virus es de alta importancia, debido a que de las tres vías posibles de contagio de la enfermedad de Chagas, la vectorial es la predominante en el área endémica, siendo imprescindible profundizar aún más en el conocimiento de los insectos huéspedes para optimizar su control.

Los resultados de esta labor, amplían considerablemente la información existente sobre este virus en Argentina, siendo de suma importancia además para el resto de los países afectados por la enfermedad. Si bien no fue posible la replicación del virus *in vitro*, nada se conocía al respecto sobre TrV. Es por ello que se intentará su replicación en líneas celulares de hemípteros, donde se han citado resultados exitosos en virus muy cercanos filogenéticamente. Se esbozan datos novedosos sobre la distribución geográfica y de ambiente; hospedero y variabilidad genómica de las especies analizadas. Si bien no ha sido uno de los objetivos de este trabajo de tesis, el desarrollo de la misma, permitió ampliar el estudio del virus para poder llegar a utilizarlo en un futuro inmediato, como ya se ha mencionado, como agente de control biológico.

Palabras claves: TrV, Triatominae, Enfermedad de Chagas.

**ABSTRACT**

The American Trypanosomiasis is the most important health problem in Argentina, affecting about 1.6 million people. The World Health Organization considers Chagas disease as one of the greatest scourges of Latin America: some 18 million people suffer the consequences and 120 million are at risk of infection. Although the disease is mainly distributed in Latin America in recent decades have seen more often in the United States, Canada, many European countries and some Western Pacific.

To date, control of this disease is based solely on insecticides that carry multiple problems in their misapplication and low selectivity, because they eliminate both natural enemies of other species of triatomines beneficial to man, causing a major deterioration in the environment, causing all these insects are increasingly resistant to insecticides applied.

The introduction or increase of natural enemies in natural populations of key species that transmit Chagas disease, can be achieved over time reducing the number of vectors at levels that ensure the interruption of transmission of infection in susceptible population. Note that the negative aspects of spraying campaigns and the prospect that these difficulties become severe, has motivated the search for new control methods for home and peridomestic triatomines have been identified as a priority area of research by the World Health.

Triatoma virus (TrV) is the only entomopathogenic virus identified in triatomines so far. There are observations that would support the use of TrV as a biological control. Muscio in 1997, reported rates over 90% mortality in the laboratory nymphal stages of *T. infestans* infected with TrV. In addition, Rozas-Dennis & Cazzaniga in 2000, observed that



infection with TrV reduces longevity and fecundity of adult females, and infected nymphs show paralysis in the legs and difficulty to get rid of the exuvia.

According to the International Committee on Taxonomy Viral (ICTV), TrV Dicistroviridae belongs to the family whose type species is the virus Cricket paralysis, with a single genre: Cripavirus. Is a single strand RNA viruses and positive direction, a length of 9010 bases and a predicted molecular mass of 2886.4 KDa. The composition of virions from TrV RNA is 35% and 65% protein. The genome has two open reading frames called ORF1 and ORF2 encoding nonstructural proteins and capsid respectively, separated by an intergenic region (IGR).

According to studies conducted so far, TrV can be transmitted mainly by horizontal transmission through fecal-oral route, as well as a way vertical (transovarial). Its distribution in nature is only restricted to *T. infestans* and *T. sordida*. So far no studies inherent in the search for TrV in Latin America: at present only found in Argentina.

The main objective of this study was, first study the diversity of TrV in triatomines of our country and get a system for TrV replication in vitro. Thus, triatomines were analyzed from 10 provinces of Argentina from 2008 until 2011, giving a total of 1632 specimens belonging to 10 species of address, the wild and peridomestic *T. infestans*, *T. guasayana*, *T. delpontei*, *T. breyeri*, *T. eraturysiforme*, *T. sordida*, *T. platensis*, *T. garciabesi*, *Panstrongylus guentheri* and *Psammolestes coreodes*. The above species were captured on the campaign trail, obtained from the material preserved in the collection of our laboratory or sent to other centers. All insects were extracted fecal RNA extract and then finally analyze by RT-PCR. The positive outcomes resulting from the RT-PCR were 29. These resulting products were purified, quantified and were sent to

sequencing. The analysis of samples showed no variability sequenced genomic significant. This was reflected both at species, and habitat and geographic distribution of triatomines.

Having lines or cell cultures susceptible to infection with TrV could bring great benefits. Allow to isolate, characterize and study in depth the biology of the virus would allow us to obtain mass viral, being a fundamental tool for possible use as biological control agent. Although not known to TrV susceptible cell lines, we attempted replication in lines of Diptera and Lepidoptera. Unknown also occur if the virus cytopathic effect visible in the cells.

On this one overriding objective, we attempted TrV replication in cell culture. On one hand, insect cell lines, using different methods: transfection, electroporation, with trypsin and inoculated with purified virus. On the other hand tried to get healthy vinchucas primary culture. For this we used triatomines of the colony of our laboratory. The substrates for the realization of the primary culture were embryos and adult (with or without trypsin and explants) were inoculated in addition embryonated eggs. For all tests described above methods and techniques were used for SDS-PAGE, Western blotting (WB), indirect immunofluorescence (IIF) or RT-PCR to confirm the presence of TrV in cells. To evaluate the allantoic fluid was used the technique of hemagglutination (HA). It was not possible replication in vitro TrV dipteran cell lines (C6/36) and Lepidoptera (SF9, SF21, HighFive). Nor was it possible to clone cellular basis of adult or embryonic tissues of healthy kissing bugs. As for the presence of virus in allantoic fluid by HA, in no case resulted positive, nor suspected to be infected using supernatants. However TrV purified virus used as a control, agglutinated chicken RBCs. Laboratory analyzes of electron microscopy, SDS-PAGE, WB, IFA, RT-PCR

also obtained satisfactory results.

This thesis represents the largest study done so far in TrV of triatomines in Argentina and around the world.

The recording of this virus is of high importance because of the three possible routes of transmission of Chagas disease, the vector is predominant in the endemic area, being essential to further deepen the knowledge of insect hosts to optimize their control.

The results of this work, significantly expand existing information on this virus in Argentina, besides being of great importance for the rest of the countries affected by the disease. If it was not possible virus replication in vitro, nothing was known about it on TrV. That is why we will attempt replication in cell lines of Hemiptera, where successful results have been cited in virus phylogenetically very close. It outlines novel data on the geographic and environment, host and genomic variability of the species analyzed. While there has been one of the objectives of this thesis, the development of it, broadened the study of viruses in order to get to use in the immediate future, as already mentioned, such as biological control agent.

Keywords: TrV, Triatominae, Chagas' disease.

## CAPÍTULO I

### 1.1-INTRODUCCIÓN GENERAL

#### 1.1.1- TRIPANOSOMIASIS AMERICANA

La Organización Mundial de la Salud considera a la enfermedad de Chagas como uno de los mayores flagelos de América Latina, estimando que 18 millones de personas sufren sus consecuencias y 120 millones están en riesgo de infección (WHO, 2005; OPS, 2006). El Chagas es el problema sanitario más relevante de la Argentina que afecta a 1,6 millones de personas.

Esta enfermedad se la conoce además como Tripanosomiasis americana y lleva el nombre del médico brasileño Carlos Chagas quien la descubrió en 1909. Es una infección parasitaria hemática e hística causada por un protozoo flagelado: el *Trypanosoma cruzi*. Este parásito es hematófago, se reproduce en los tejidos por división binaria, múltiple y progresiva, pasando por una forma denominada “amastigote” (no flagelada) que se ubica en los tejidos, especialmente en miocardio, donde luego de un largo período evolutivo, produce lesiones cardíacas irreversibles en aproximadamente un 15 a 40 % de los individuos afectados (Storino y Milei, 1994; Lorca, 2001; Gascon et al., 2007; Rassi et al., 2010). Se estima que es una de las principales causas de muerte por enfermedades parasitarias (Peck, 2009) y según los datos de la Organización Mundial de la Salud, en el 2008 esta enfermedad causó la muerte a más de 10.000 personas (WHO, 2010).

Si bien la enfermedad de Chagas se distribuye principalmente en América Latina, en las últimas décadas se ha observado con mayor frecuencia en los Estados Unidos, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental. Esto obedece sobre todo a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo. Su distribución geográfica se extiende desde el paralelo 40 de latitud norte (en el sur de Estados Unidos en América del Norte), al paralelo 45 de latitud sur de Argentina y Chile (Hayes y Schofield, 1990). El proceso de urbanización en América Latina, intensificado en la segunda mitad del siglo XX, ha modificado el perfil epidemiológico de esta enfermedad, y los movimientos migratorios desde los países endémicos han posibilitado que la enfermedad de Chagas sea diagnosticada en zonas

donde la infección no es endémica (Sztajzel et al., 1996; Ueno, 1995).

España se ha convertido en uno de los países europeos que recibe más inmigrantes procedentes de América Latina. La última reunión de la OPS (2006) en Montevideo se hizo eco de esta realidad, y en su informe final hace alusión a las necesidades que tienen los países receptores de inmigrantes originarios de áreas endémicas para hacer frente a la enfermedad de Chagas y poder atender adecuadamente a las personas afectadas, así como para evitar la transmisión de *T. cruzi* por las vías vertical y sanguínea (Baruch et al., 2005) (Fig.1a).

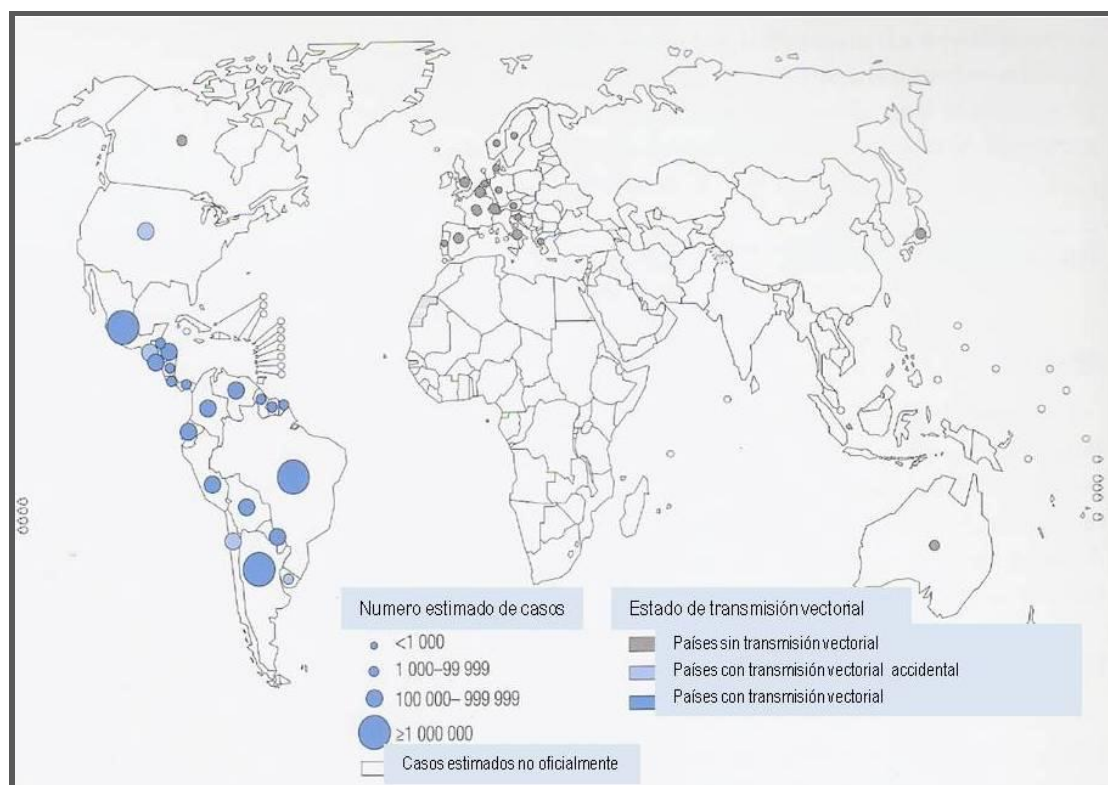


Figura 1a: Distribución de casos de infección por *T. cruzi* basado en estimaciones oficiales y el estado de la transmisión del vector a nivel mundial. Fuente: World Health Organization (2010).

La infección es propagada principalmente por vía vectorial. Se transmite a los seres humanos principalmente por las heces de insectos hemípteros hematófagos de la familia de los triatomíneos, conocidos vulgarmente en Argentina como vinchucas (de origen quechua, “que se deja caer”), siendo el más importante en nuestro país *Triatoma infestans*.



El modo de infestación es por medio de las deyecciones contaminantes de los insectos, que penetran por las escoriaciones de la piel, producidas por el rascado, luego del escozor que causa la picadura de la vinchuca. Los mamíferos son susceptibles al parásito, mientras que las aves son refractarias a *T. cruzi* (Storino, 2010).

Además de la transmisión vectorial como una de las principales, el parásito se transmite entre otras por vía connatal, transfusional y transplante de órganos (Storino, 2002) así como accidentes de laboratorios e ingesta del parásito (Brenner, 1984; Rodríguez Coura et al., 2007; Valente et al., 1999; Hofflin et al., 1987).

En el hombre, la enfermedad cursa tres periodos evolutivos (Dias, 1995). Muchos autores proponen que en la gran mayoría de los casos, después de un periodo de incubación, se instala la fase aguda de la enfermedad, luego una fase crónica que puede permanecer indeterminada o evolucionar hacia las formas crónicas definidas, cardíacas y/o digestiva, afectando sobre todo al esófago y/o colon (Carlier et al., 2002; Prata, 2001).

-Período primario o agudo: etapa donde se produce la diseminación polihística del parásito, caracterizada por un síndrome febril-infeccioso generalizado, pudiendo dar origen a una miocarditis aguda y/o meningoencefalitis aguda. Dura entre 20 a 30 días y suele pasar desapercibida por falta de síntomas, aunque pueden presentarse síntomas inespecíficos (fiebre, malestar general, cefaleas, hepatomegalia y esplenomegalia), se la suele confundir con otras enfermedades, dificultando el diagnóstico. En algunos casos puede llegar a ser muy grave (formas cardiológicas y/o neurológicas), sobre todo en niños y recién nacidos de bajo peso, que de no ser tratados precozmente, mueren en poco tiempo.

-Período secundario intermedio, inaparente, latente o crónico indeterminado: caracterizado por la disminución de la parasitemia, atenuación e incluso desaparición de los síntomas. La mayoría de las veces pasa inadvertida. Este periodo puede durar 30 años, calculándose que entre el 15 y el 40 % o entre el 20 y el 30 % de los pacientes (de acuerdo a los diferentes autores) desarrollarán la etapa crónica siguiente, con lesiones irreversibles. El resto, permanecerá en forma crónica indeterminada o latente durante toda la vida.

-Período terciario o crónico determinado: por último esta fase produce lesiones en el corazón, sistemas digestivo, nervioso central y periférico, generalmente

irreversibles: miocardiopatía dilatada, síndrome de disperistalsis esófago-gastro-entérico, disautonomía y pocas veces, neuropsicopatía. Estos cuadros podrán presentarse en forma aislada o asociada. Otra particularidad de esta etapa es la larga evolución de las lesiones, pudiéndose manifestar alteraciones crónicas luego de 15 a 30 años de la primoinfección (Storino y Milei, 1986).

Cabe destacar que el Ministerio de Salud de la Nación resalta en su guía para el tratamiento de pacientes con Chagas, que esta enfermedad evoluciona en dos fases; aguda y crónica; cada una de ellas con características clínicas, criterios diagnósticos y terapéuticos diferentes, mencionados anteriormente (Min. Salud de la Nación, 2006).

Las formas o vías de infección son:

- a) Vía entomológica: es la transmisión indirecta, ya que las formas infectantes entran al hombre a través de soluciones de continuidad o de las mucosas, vehiculizadas por las deyecciones de los vectores.
- b) Vía transfusional: en este caso, la sangre del dador es incorporada en forma directa al torrente circulatorio del receptor sano.
- c) Vía transplacentaria o congénita: la madre infectada con *T. cruzi* puede en determinadas condiciones, infectar al hijo durante la gestación o en el momento del parto.
- d) Vía oral: alimentos contaminados por deyecciones de vectores infectados con *T. cruzi*.
- e) Otras vías: los accidentes de laboratorio, por el mal manejo de pipetas con cultivo de *T. cruzi*; la manipulación de animales infectados, sean de laboratorio o silvestres, puede producir la infección del hombre a través de las escoriaciones o pequeñas soluciones de continuidad en las manos (Carcavallo, 1985; Rodríguez Coura et al., 2007).

Si bien la vía vectorial en América Latina es una de las principales vías de transmisión, la infección tripanosómica depende de la convergencia, en determinado tiempo y lugar, del agente etiológico, del insecto vector, del hospedero animal o humano y del individuo susceptible, todo dentro de un contexto geográfico favorable y de un conjunto de factores sociales, económicos y culturales. Este conjunto de factores debe permitir en forma óptima la nidificación, alimentación y reproducción de los vectores y de los reservorios y la convivencia de los mismos, generalmente tolerada por

falencias educativas, con la comunidad humana. Este conjunto de circunstancias son definidos como factores de probabilidad de infección (Rabinovich, 1973).

### **1.1.2- PARÁSITO Y VECTOR**

En 1911, Carlos Chagas describió una nueva enfermedad provocada por un protozooario flagelado, el *T. cruzi*. Así, por primera vez en la historia, Chagas reconoció una enfermedad parasitaria como una entidad clínica, identificando su agente etiológico así como al insecto vector (Chagas, 1911).

El agente etiológico de la enfermedad, el *T. cruzi* es un protozoo flagelado, que pertenece a la súper clase Mastigophora, orden Kinetoplastida, familia Tripanosomatidae, genero Trypanosoma, subgénero Schyzotripanum, sección Stercoraria (Fig. 1b). Estos parásitos, están caracterizados por tener un tamaño de 12 a 20  $\mu\text{m}$ , el cuerpo alargado de extremo posterior corto y puntiagudo, un solo flagelo y una sola mitocondria. Una red compacta y compleja denominada kinetoplasto se sitúa en el extremo posterior del cuerpo (Cortez et al., 2007).

Es un parásito intracelular con un ciclo de vida que involucra vertebrados e invertebrados. Asume diferentes tipos morfológicos y funcionales que se alternan entre un hospedador y el otro y en formas replicativas, con una multiplicación extracelular como epimastigotes en el insecto y multiplicación intracelular como amastigotes en el hospedero vertebrado. En cuanto a las formas infectivas se encuentran: tripomastigotes metacíclicos en el insecto y tripomastigotes sanguíneos en la corriente circulatoria del vertebrado (Garcia y Azambuja, 1991; Hoare y Wallace, 1966; Pessoa y Martins, 1977).

Los reservorios naturales del parásito son, además del propio hombre, los animales silvestres: primates, roedores, marsupiales, entre otros.



Figura 1b: *T. cruzi*, parásito de la enfermedad de Chagas.

Los vectores son las llamadas vulgarmente “vinchucas”, que albergan el parásito que causa esta patología. Pertenecen al Orden Hemiptera, Infraorden Cimicomorpha, Superfamilia Reduvidioidea, Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae (Grimaldi y Engel, 2005). En nuestro país, *T. infestans* es el principal vector de *T. cruzi* (Segura et al., 1999). *T. infestans* es de hábitos antropófilos y actividad nocturna, se trata de un insecto que desde el punto de vista ontogénico, posee tres fases: huevo, cinco estadios inmaduros llamados ninfas y adulto (Fig. 1c). Junto con *Rhodnius prolixus*, *T. infestans* es una de las especies de mayor importancia en la transmisión de *T. cruzi* en América (Lauricella, 2005) (Fig. 1d).

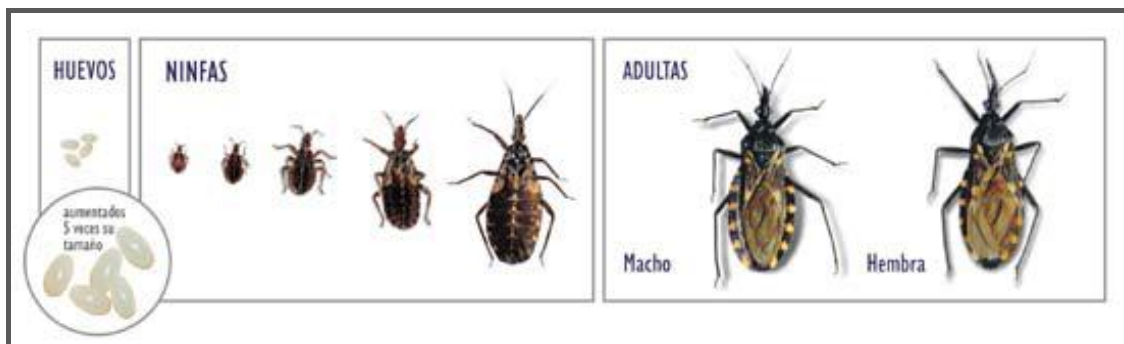


Figura 1c: Metamorfosis incompleta de triatominos. Fuente: Marti y Sanmartino (2008).

Su alimentación es exclusivamente hematófaga, de carácter discontinuo y funciona como agente regulador de los procesos metabólicos. En cada estadio, después de que se ha alimentado y en dependencia del estado de desarrollo del insecto, temperatura del ambiente y fuente de alimento, ocurre la sustitución del exoesqueleto viejo por el nuevo: proceso denominado muda o ecdisis, permitiendo de esta manera el crecimiento corporal del triatomino. La última muda culmina con la metamorfosis, cuando las ninfas sufren transformaciones morfológicas incompletas y adquieren las características del adulto: insectos hemimetábolos (Lent, 1948; Buxton, 1930; Wiggelesworth, 1972; Azambuja y Garcia, 1997).



Figura 1d: *T. infestans* (Klug): principal vector de la enfermedad en nuestro país (vista dorsal).

El ciclo de *T. cruzi* se desarrolla en el hombre y en el triatomino (Fig. 1e): se inicia cuando un insecto hematófago infectado pica a un ser humano y defeca. Los tripomastigotes metacíclicos se transmiten en las heces. Entran en el huésped a través de la herida o por el cruce de las membranas mucosas. Los *T. cruzi* se diseminan por el torrente sanguíneo alcanzando distintos órganos, preferentemente corazón, músculos, sistema nervioso, aparato



digestivo y sistema reticuloendotelial. En estos tejidos, se reproducen por fisión binaria, se multiplican rápidamente y pasando luego de una forma flagelada a una no flagelada, denominada amastigotes (de Lana y Tafuri, 2005). Después de la reproducción, una gran cantidad de amastigotes se encuentran en la célula infectada, formándose verdaderos nidos o pseudoquistes que producen complejos fenómenos inmunopatológicos y reacción inflamatoria que participarán en la patogenia de las lesiones y prolongarán la enfermedad (Storino et al; 2003). Luego de aproximadamente diez duplicaciones, el amastigote se convierte en tripomastigote y la célula se rompe, generando de esta manera que queden en circulación. De este modo, invaden otras células del organismo hospedador. El tripomastigote vuelve a infectar otra célula repitiéndose el ciclo de multiplicación. Esto genera una parasitemia persistente en el vector que al absorber sangre, reiniciará la transmisión de la enfermedad. Si bien, el número de parásitos circulantes se verá limitado por la respuesta inmune del huésped, esta será incapaz de erradicarlo (Storino y Milei, 1986).

El ciclo de *T. cruzi* prosigue cuando un triatomino, libre de infección se contamina al alimentarse del mamífero o del hombre parasitado. Los parásitos circulantes ingeridos se transforman en esferomastigotes en el estómago del insecto del vector, y son los responsables de la persistencia de la infección en el insecto. Luego los esferomastigotes se diferenciarán a epimastigotes, que se multiplicarán en su progresión por el tubo digestivo hacia la ampolla rectal y es ahí donde se diferenciarán en tripanosomas metacíclicos. El triatomino parasitado cuando vuelva a alimentarse, eliminará con las heces los tripanosomas infectantes y de esa manera se reiniciará el ciclo evolutivo natural de la enfermedad (Storino y Milei, 1994).

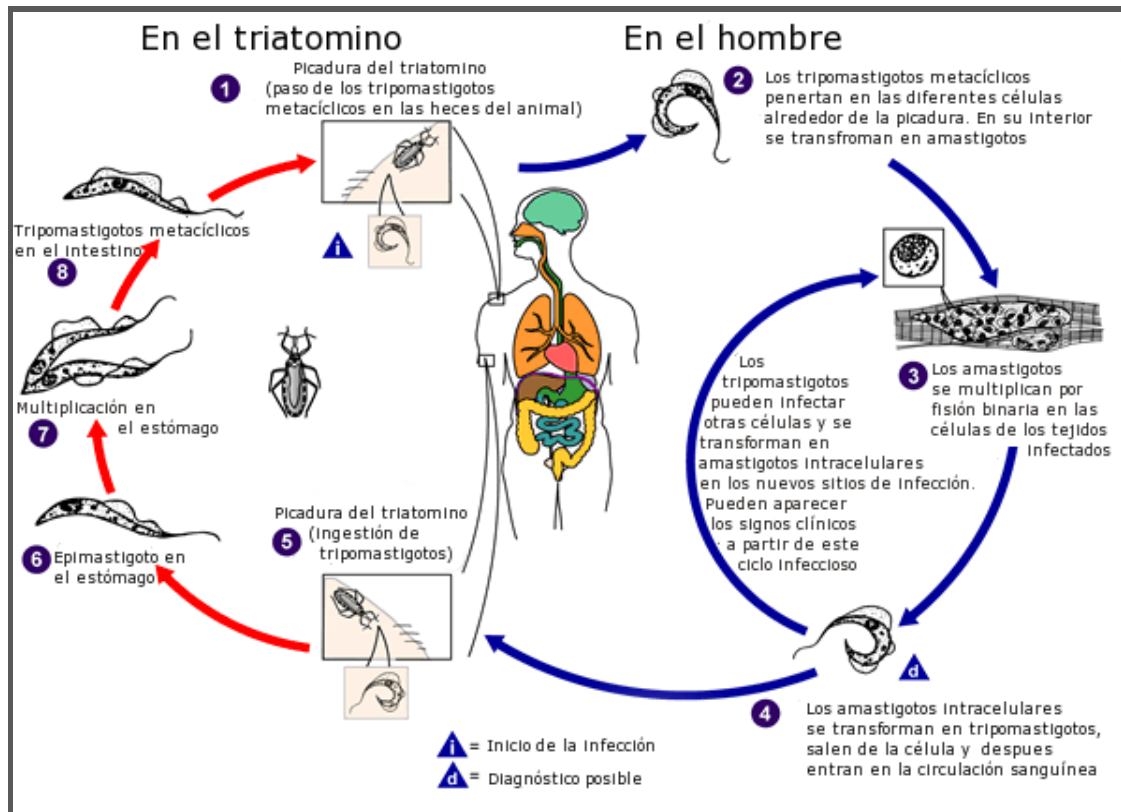


Figura 1e: Ciclo de *T. cruzi* en el triatomo y el hombre.

Fuente: [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmericana\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmericana_il.htm)

### 1.1.3- VIRUS: CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los virus son parásitos intracelulares obligados, de muy pequeño tamaño. Replican dentro de las células que infectan utilizando para ello toda la maquinaria biosintética del hospedador. Dentro de la célula hospedadora apropiada, la expresión de la información contenida en el genoma viral dirige la síntesis de los componentes del virión y de las proteínas necesarias para su replicación. La progenie del virión ensamblado durante el ciclo infeccioso sirve para la transmisión de nuevos virus a la siguiente célula, donde es desensamblado, comenzando así, el siguiente ciclo infeccioso (Flint et al., 2004).

El "International Committee on Taxonomy of Viruses" (ICTV) reconoce actualmente la existencia de más de 3600 especies de virus, agrupándolas en más de 50 familias distintas (Fauquet et al., 2005). La clasificación de los virus se basa en la morfología del virión (la partícula vírica totalmente ensamblada e infectiva), la organización de su genoma, el modo de replicación y el número y tamaño de las proteínas estructurales y no-estructurales,

obteniendo de esa manera distintas familias y géneros (van Regenmortel., 2000). A su vez, las distintas especies de virus que pertenecen a una familia o género particular, se distinguen y definen en función de la divergencia genética, rango de hospedador natural, el tropismo celular, la patogenicidad, el modo de transmisión, las propiedades fisico-químicas del virión o las propiedades antigénicas de las proteínas virales (Mahy y van Regenmortel, 2008).

#### **1.1.4- FAMILIA DICISTROVIRIDAE**

Inicialmente el virus fue clasificado dentro de los *Picornaviridae*: solo unos pocos virus ARN de insectos se habían clasificado dentro de esta familia (Muscio et al., 1988). Luego Czibener, en su tesis doctoral estudió el genoma de TrV, mediante el análisis de secuencias aminoacídicas del mismo, y comparándolo con los otros virus de insectos de características similares a TrV, evidenció que compartían caracteres como para proponerlo dentro del grupo de los “Cricket paralysis like viruses” (CrPV like-viruses), diferenciándolos de esta manera de la familia *Picornaviridae*, para luego pasar a componer la familia *Dicistroviridae* (Czibener, 2003; Czibener et al., 2000).

Así, los *Picornaviridae* quedan restringidos a virus que afectan vertebrados, mientras la nueva categoría taxonómica tiene como hospedadores, únicamente a invertebrados. En la actualidad, el virus pertenece a la nueva familia *Dicistroviridae* (Mayo, 2002) cuya especie tipo es el virus de la parálisis del grillo, con un único género: Cripavirus. De acuerdo al International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV), TrV es miembro de los *Dicistroviridae*, junto con otras 7 especies: Drosophila C virus (DCV), Aphid lethal paralysis virus (ABPV), Cricket paralysis virus, Black queen cell virus, Himetobi P virus, Plautia stali intestine virus y Rhopalosiphum padi virus (ICTV, 2002 on line).

Los *Dicistroviridae* contienen un genoma ARN, monocatenario positivo, incluyéndose de esta manera dentro del grupo IV de la Clasificación de Baltimore (Fig. 1f). Algunos insectos comúnmente infectados por los Dicistrovirus incluyen áfidos, cicadellas, moscas, abejas, hormigas y polillas. Son virus de simetría icosaédrica, de 30 nm de diámetro y sin envoltura.

Su nombre deriva de los dos ORF o cistrones que codifican el genoma viral. Hasta el momento existe solo un género denominado Cripavirus cuya

nominación deriva del virus de la parálisis del grillo. Se ha propuesto recientemente un segundo género: Aparavirus, pendiente de aprobación por el ICTV (Squires, comunicación personal). Este género debe su nombre al virus de la parálisis aguda de la abeja. Este género propuesto se distingue de acuerdo a la distancia filogenética y a la estructura particular de la región intergénica de sitio de entrada al ribosoma (IGR IRES) (Bonning y Miller, 2010).

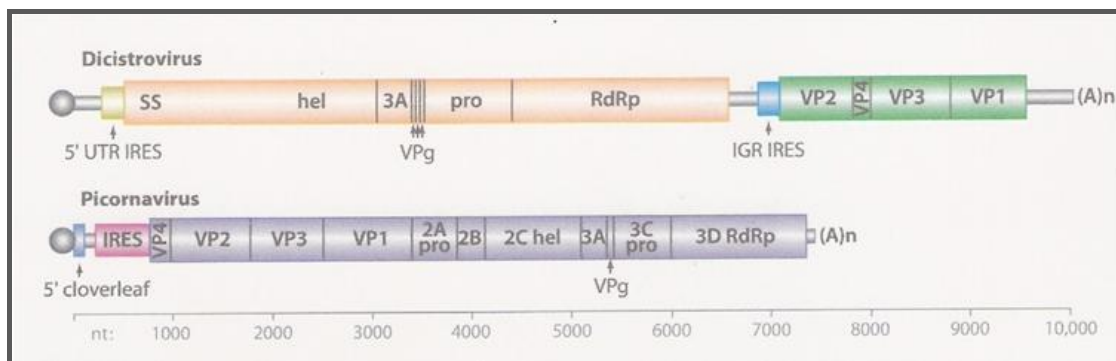


Figura 1f: Esquema de la organización genómica de los *Dicistroviridae* y *Picornaviridae*. Las cajas naranja, verde y violeta indican los ORF. En verde se representa el ORF2, responsable de la codificación de las proteínas estructurales de los Dicistrovirus. Fuente: Bonning y Miller (2010).

La estructura de los dicistrovirus consiste en partículas de simetría icosaédrica (PseudoT=3) con 60 copias de tres proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3). La VP4 que está codificada entre la VP2 y la VP3, es empaquetada como proteína de fusión con el N terminal de la VP3, formando en conjunto un anillo alrededor del eje del pentámero internamente (Bonning y Miller, 2010) (Fig. 1g).

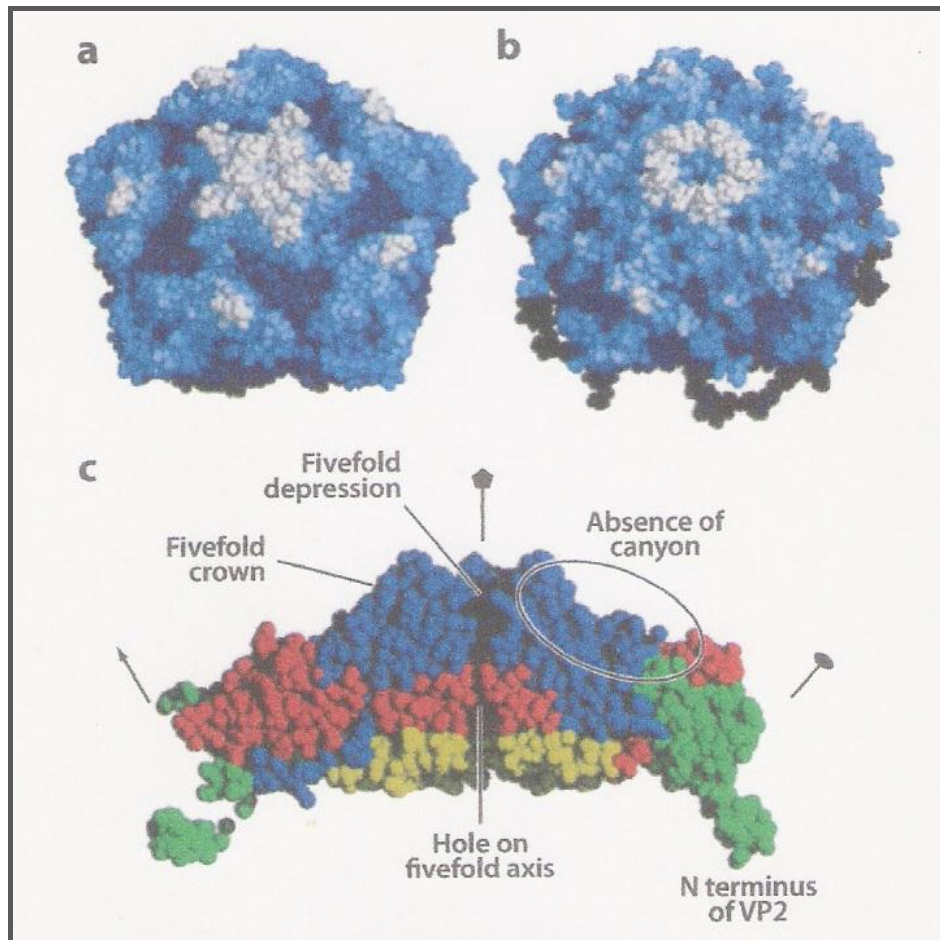


Figura 1g: Estructura de los *Dicistroviridae*.

Comparación de los pentámeros del virión del poliovirus y CrPV. (a) Pentámero del Poliovirus: Note el profundo cañón que rodea el eje de cinco puntas. Esto es necesario para la unión al receptor. (b) Pentámero del virión del CrPV. Note que el virión del CrPV carece del cañón. (c) Corte a través del pentámero del CrPV, orientándose el interior del virión en la parte inferior de la figura. VP1, VP2, VP3, VP4, son de color azul, verde, rojo, y amarillo, respectivamente. Las principales características se indican en la figura. Fuente: Bonning and Miller (2010).

#### 1.1.5- TRIATOMA VIRUS (TrV): CARACTERÍSTICAS, TRANSMISIÓN Y CONTROL BIOLÓGICO

##### Morfología, estructura y replicación

La composición de los viriones de TrV es 35% de ARN y 65% de proteínas (Czibener et al., 2000). El ARN es de hebra simple y sentido positivo, con una longitud de 9.010 bases y una masa molecular teórica de 2.886,4

KDa.

El genoma posee dos marcos abiertos de lectura: ORF1 y ORF2 de 5387 y 2606 nt respectivamente, que codifican las proteínas no estructurales y de la cápside, separados por una región intergénica –IGR– de 172 nt. Las proteínas no estructurales, se codifican en el primer marco abierto de lectura, próximo al extremo 5' y que viene precedido de una estructura de ARN que sirve como sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para la traducción de las proteínas virales (5' UTR IRES de 548 nt). El orden en el ORF 1 es el siguiente: helicasa, proteasa, ARN polimerasa ARN dependiente.

Desde el nt 5936 al nt 6109 se halla una región intergénica no codificante de 172 nucleótidos de largo y en ambos extremos 5' y 3', se encuentran regiones no codificantes denominadas UTR, de 550 y 295 nucleótidos respectivamente (Czibener et al., 2000; 2005) (Fig. 1h).

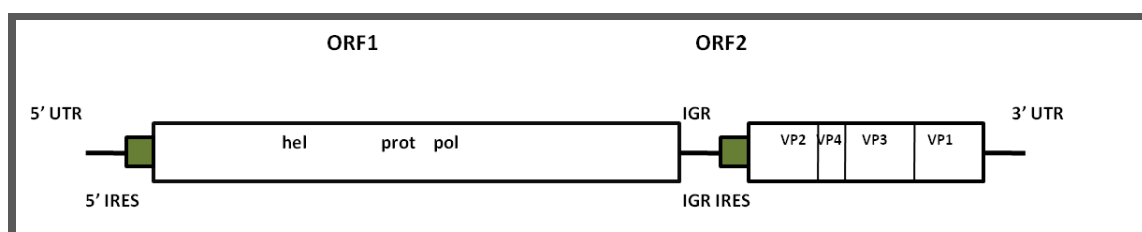


Figura 1h: Esquema de la estructura genómica de TrV. El ORF1 comienza en el nucleótido 549, con 5387 nt. La región intergénica, de 172 nt, abarca del nt 5936 al 6109. El ORF2 con 2606 nt. Fuente: Czibener et al., (2000).

El ORF 2 codifica las proteínas estructurales del virión denominadas VP1, VP2 y VP3, cuyas masas teóricas son de 29,7 KDa; 28,4 KDa y 31,8 KDa respectivamente. La cuarta proteína, denominada VP4, tiene una masa teórica de 5,5 KDa. Agirre en su trabajo de tesis concluye que la VP0 es una de las proteínas mayoritarias en la composición de las cápsides vacías, encontrando además otras bandas de mayor y menor movilidad electroforética que las proteínas canónicas del virus. La presencia de una mayor concentración de VP0 en la muestra de cápsides vacías sugiere que el corte catalítico de VP0 está asociado a la encapsidación del ARN (Agirre, 2009; Agirre et al., 2011).

Cada ORF es traducido a una poliproteína la cual es subsecuentemente clivada por proteasas en proteínas individuales.

Del mecanismo de replicación de TrV poco se conoce. Se cree que utiliza

el mismo mecanismo que los picornavirus. Sin embargo, el virión a diferencia de los picornavirus, carece de la estructura denominada “cañón”, y aunque se desconoce el receptor celular de los dicistrovirus, se sabe que la entrada ocurre por endocitosis mediada por clatrina. El mecanismo de replicación estudiado es el de los discistrovirus en general. Luego de entrar a la célula, el virus se desnuda, liberando el ARN genómico al citoplasma (Bonning y Miller, 2010). El ARN de los dicistrovirus no posee el CAP en el 5' por lo cual se traduce por medio de estructuras conocidas como IRES. El IRES es una estructura de ARN del genoma viral que recluta los ribosomas al ARNm sin requerimiento del CAP para que el ribosoma escanee desde el 5'. Los dicistrovirus tienen dos IRES muy distintos pero bien caracterizados que facilitan la traducción de los dos ORFs: en el 5', uno llamado UTR IRES (río arriba del ORF 1) y el segundo en la región intergénica, el IGR IRES (río arriba del ORF 2). Ambos son diferentes entre sí, y diferentes entre otros IRES y realizan la traducción de cada ORF por separado. El IGR IRES es uno de los mejores caracterizados hasta el momento. En contraste al IGR IRES, el 3' UTR IRES de los dicistrovirus no tiene una estructura conservada. El UTR si necesita de factores de iniciación, y el IGR no.

Los genomas dicistrónicos de los dicistrovirus han revelado un mecanismo totalmente nuevo de traducción en eucariotas. La región IGR IRES facilita la traducción en ausencia de factores de iniciación imitando al tRNA (Schuller et al., 2006). Distintos estudios bioquímicos y genéticos demostraron que la región IGR IRES del CRPV es capaz de unirse a las subunidades ribosomales 40S en ausencia de factores de iniciación de la traducción GTP y tRNA-Met (Deniz et al., 2009). La unión del IGR IRES a la subunidad 40S resulta en un cambio conformacional de esta subunidad y permite la apertura del canal de unión al mensajero (Passmore et al., 2007). Este cambio conformacional demuestra que el IRES es capaz de “manipular” al ribosoma y sugiere que el IRES funciona como un factor de traducción basado en ARN (Kieft, 2008). La región 5' UTR IRES actúa por un mecanismo clásico utilizando factores de iniciación (Roberts y Gropelli, 2009).

Cabe destacar que la iniciación de la traducción en el segundo ORF no es necesariamente AUG-dependiente. Otros aminoácidos han sido encontrados como residuos N-terminal del ORF 2 en CRPV y DCV, alanina y en TrV, leucina (Masoumi et al., 2003; Herts y Thompson, 2011).

### Transmisión natural de TrV

De acuerdo a los estudios realizados hasta el momento, TrV puede transmitirse principalmente por vía horizontal, mediante la ruta fecal-oral, como así también por una vía vertical (transovárica) (Marti, 2005; Muscio et al., 1997; 2000).

Las observaciones realizadas por Muscio en 1988 indican la presencia de partículas de TrV en células epiteliales del intestino medio de *T. infestans*. Dicho virus replica en el citoplasma de las células intestinales, induciendo pronunciadas alteraciones en mitocondrias y membranas celulares en aproximadamente 6 hs luego de su inoculación intrahemocélica (Muscio, 1987). Coincidiendo con estas observaciones, posteriormente mediante estudios histopatológicos se corroboró la presencia de TrV en células epiteliales del intestino medio, buche y en las gónadas femeninas de *T. infestans* mientras que por observaciones al microscopio electrónico solo observaron partículas virales en epitelio intestinal (Marti, 2005).

Por el hábito gregario de los triatomíneos al momento de alimentarse la transmisión fecal-oral adquiere una mayor importancia en la transmisión. Este comportamiento densodependiente se puede observar en las colonias de *T. infestans* con TrV en el laboratorio del CEPAVE que ante la incorporación de insectos libres de TrV rápidamente se infectan con el virus.

### Especies susceptibles a TrV

La susceptibilidad de las especies se ha determinado por vía oral, vía intrahemocélica y por infecciones naturales encontradas en el campo. Por vía oral (ingesta de partículas virales) se observó la susceptibilidad en *T. infestans* (Muscio, 1988; Rozas-Dennis y Cazzaniga, 2000; Marti, 2005); *T. guasayana* (Rozas-Dennis, 2007) y *T. patagonica* (Rozas-Dennis et al., 2002). Por vía intraehemocélica TrV replicó en todas las especies inoculadas: *T. infestans*, *T. platensis*, *T. delpontei*, *T. pallidipennis*, *T. rubrovaria* y *R. prolixus* (Muscio, 1988).

Muscio (1988) menciona la presencia de TrV en *T. infestans* capturados en un peridomicilio en la provincia de Córdoba. Posteriormente en la misma región fue encontrado por el Dr. Marti (2005); y luego de varios años de muestreo en el laboratorio del CEPAVE se ha registrado en *T. infestans* en 8 provincias en domicilios y peridomicilios y en *T. sordida* en un domicilio de la



provincia de Chaco (Marti et al., 2009).

Teniendo en cuenta las tres vías de infecciones por TrV, la nómina de especies susceptibles es de nueve y en la naturaleza se restringe solamente a *T. infestans* y *T. sordida*. Hasta la fecha, no se han publicado los estudios inherentes a la búsqueda de TrV en Latinoamérica. Los datos existentes son únicamente de Argentina.

### **Control biológico: los virus como posibles agentes de control biológico y el caso de TrV**

El control biológico o la regulación de la población por acción de enemigos naturales ofrece una buena alternativa para reemplazar el uso de productos de síntesis, que pueden ser eficientes en mediano y largo plazo y que raramente desarrollan resistencia, además estos métodos son altamente selectivos y seguros para el medio ambiente (Huffaker et al., 1971).

La introducción o el incremento de enemigos naturales en poblaciones naturales de las principales especies transmisoras de Chagas, podría lograr con el tiempo la reducción del número de vectores a niveles que aseguren la interrupción de la transmisión del parásito en la población susceptible (Marti, 2010).

Los insecticidas que se han utilizado hasta el presente para controlar a los vectores de la enfermedad de Chagas, acarrean múltiples problemas: no se aplican de manera correcta, no son selectivos debido a que eliminan tanto a enemigos naturales de los triatomíneos como a otras especies benéficas para el ser humano, producen un gran deterioro en el medio ambiente, y lo más relevante es que los insectos cada vez son más resistentes a dichos insecticidas (Picollo et al., 2005; Santo Orihuela et al., 2008; Toloza et al., 2008; Germano et al., 2010a; Germano et al., 2010b; Lardeux et al., 2010; Zerba 1999; Segura et al., 2001).

Además los costos de los insecticidas se incrementan constantemente, existen grandes riesgos de intoxicación para los operarios que los aplican (Casida y Quistad 1995; Elliot 1995; Perry 1998; Naumann 1990) y se ha documentado que al interrumpir los programas de control en zonas rurales del noroeste de la Argentina, basados en el uso exclusivo de insecticidas, las poblaciones de *T. infestans* han llegado a la densidad de individuos previa a las aplicaciones de químicos en un período aproximado de 2 años (Cecere et

al., 2003).

Una larga lista de triatominos que excede las 60 especies han sido halladas en la naturaleza afectadas por depredadores, parasitoides, ecto y endoparásitos y patógenos, así como otras asociaciones simbióticas (Jenkins, 1964; Barrett, 1976; Roberts y Strand, 1977; Lent y Wygodzinsky, 1979; Roberts, 1980; Daoust, 1983; Ryckman y Blankenship, 1984; Weiser, 1991; Marti, 2010).

El Triatoma virus (TrV), como se mencionó anteriormente, es el único virus entomopatógeno identificado en triatominos hasta el momento (Muscio et al., 1987). Utilizando microscopía electrónica otros investigadores han encontrado algunas partículas similares al virus que forman matrices paracristalinas en las células del tubo Malppighi y fibrillas intranucleares de especímenes de *T. infestans* y *Panstrogylus megistus* de Brasil (Dolder y Mello, 1978 a, b), pero estas partículas no fueron descriptas en detalle. Sin embargo no es probable que estas partículas correspondan a TrV debido a que no tienen efectos biológicos sobre estos insectos. Trabajos previos que sustentarían el uso de TrV como control biológico, serían el registro de porcentajes superiores al 90% de mortalidad en el laboratorio en estados ninfales de *T. infestans* infectados con TrV (Muscio et al., 1997); así como la variación en la duración del estadio ninfal entre ejemplares sanos e infectados. El registro fue de 100 días (Perlowagora – Szumlewicz, 1976), 141 días (Rabinovich, 1972), y 166 días (Carcavallo, 1972), siendo de 286 días la duración del estado ninfal en insectos infectados con TrV (Marti, 2005). Por otro lado, Rozas-Dennis y Cazzaniga (2000) observaron que la infección con TrV reduce la longevidad y la fecundidad de las hembras adultas, y que las ninfas infectadas muestran parálisis en las patas y dificultad para desprenderse de la exuvia.

Actualmente los principales esfuerzos para combatir al vector de la enfermedad es la utilización de piretroides (sustancias químicas de estructura similar a las piretrinas, letales para los insectos, pero de gran persistencia en el ambiente).

Es por ello, que uno de los aspectos interesantes en emplear a TrV como agente de control de triatominos, es que este método complementaría a los métodos al presente existentes basados en el rociado domiciliario con insecticidas piretroides:

- 1) Existen estudios que indican la aparición de resistencia, así

como estudios que demuestran la existencia de dicha resistencia a los insecticidas empleados en las fumigaciones domiciliarias (Vassena, et al., 2000; Picollo et al., 2005; Cecere et al., 2006 a, b; Porcassi et al., 2006; Fabro et al., 2012; Germano et al., 2012; Carvajal et al., 2012). En la última década, sin embargo, diferentes niveles de resistencia a piretroides se han detectado en Bolivia, el sitio de origen y dispersión de *T. infestans* (Panzera et al., 2004), y en algunas zonas vecinas de Argentina (Santo Orihuela et al., 2008). En otros vectores de enfermedades, la reducción de la penetración, el aumento de las capturas, la resistencia metabólica y las alteraciones en el sitio de destino, como la modificación de la conducta, son unos de los mecanismos reconocidos de la resistencia (Ranson et al., 2002).

2) Incrementar la infección natural con TrV resulta interesante, ya que naturalmente el virus se dispersaría infectando también a insectos peridomiciliarios y silvestres.

3) Contrariamente a lo que ocurre con los insecticidas convencionales que poseen un limitado poder residual (Cecere et al., 2006a), el poder residual de TrV empleado como insecticida sería inestimablemente prolongado, ya que una vez instalada la infección viral esta se propagaría indefinidamente por descendencia y transmisión horizontal.

Por otra parte, los aspectos negativos en las campañas de rociado indicados anteriormente y la perspectiva que esas dificultades se agraven, ha motivado a que la búsqueda de nuevos métodos de control de triatomos, tanto en domicilio como en peridomicilio, haya sido identificada como un área prioritaria de investigación (WHO-TDR, 2005). Las campañas de rociado se basan exclusivamente en la eliminación de *T. infestans* en Sudamérica, sin embargo, diversas especies de triatomos que son silvestres o que habitan los peridomicilios (denominadas especies secundarias) y que no son actualmente el objetivo del control de la transmisión de la enfermedad de Chagas, podrían convertirse en vectores de *T. cruzi*, durante o después de la eliminación de *T. infestans* de los domicilios como resultado del tratamiento con insecticidas piretroides (Carcavallo y Martínez, 1985; Noireau et al., 1999; 2000; Cecere et al., 2002).

Debido a que, de las tres vías más frecuentes de contagio de *T. cruzi*, la vectorial es la predominante en el área endémica, es imprescindible profundizar aún más en el conocimiento de los insectos hospederos, para

optimizar su control. Si bien no es uno de los objetivos de este trabajo de tesis, el desarrollo de la misma, permitirán ampliar el estudio del virus para llegar a utilizarlo en un futuro, como ya se ha mencionado, como agente de control biológico.

## 1.2- HIPÓTESIS

Con estas herramientas se plantean las siguientes hipótesis:

- Triatoma virus en la naturaleza es específico de *T. infestans* y excepcionalmente se encuentra en otros triatominos: el hallazgo en *T. sordida* fue accidental.
- TrV está asociado a *T. infestans* que se encuentran en domicilio y peridomicilio donde las poblaciones son más numerosas facilitando la transmisión por el hábito gregario al momento de alimentarse.
- TrV presenta variabilidad genómica de acuerdo a la distribución geográfica de la especie de triatomino.
- TrV presenta variabilidad genómica dependiendo de la especie de triatomino que se esté analizando.
- La obtención de virus mediante su replicación en cultivos celulares y cultivos primarios proporcionará una masa viral de mejor pureza y a mayor escala para estudios posteriores

## 1.3- OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

A partir de estas hipótesis, se proponen los siguientes objetivos:

### Objetivo general 1:

- Estudiar la diversidad de TrV en triatominos de Argentina de acuerdo a su distribución geográfica por medio de análisis de secuencias genómica.

### Objetivos específicos:

- Obtener secuencias de TrV en especies de triatominos de Argentina.
- Analizar mediante programas informáticos las diferentes secuencias de TrV según su distribución geográfica.
- Analizar si se encuentran diferencias entre las secuencias aisladas de en *T. infestans* respecto a otras especies de triatominos.

**Objetivo general 2:**

- Obtener un sistema para la replicación de TrV *in vitro*

**Objetivos específicos:**

- Obtener TrV *in vitro* mediante inoculación de cultivos celulares adecuados.
- Obtener TrV *in vitro* mediante cultivos primarios de *T. infestans* libres de TrV.

#### **1.4- RELEVANCIA DE LA INVESTIGACIÓN**

Desde el año 2008, con la finalidad de incrementar los estudios existentes sobre TrV, se continuó con la búsqueda de este virus en poblaciones naturales de *T. infestans*, el principal vector de la enfermedad de Chagas en Argentina, enfatizando la búsqueda en poblaciones de triatomíneos silvestres.

Este trabajo de tesis ampliará la información sobre la diversidad y distribución de virus mediante el análisis de secuencias pudiendo así, conocer si el virus posee cambios en su genoma, dependiendo de la especie o el lugar geográfico que se analice.

Además, contar con líneas o cultivos celulares sensibles a la infección con TrV permitirá aislar, caracterizar y producir grandes cantidades de virus que podrían ser utilizados como herramienta fundamental en su utilización como un posible agente de control biológico.

En el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) se aisló por primera vez este virus en el año 1987 y desde entonces se mantuvo una continuidad en las diferentes investigaciones, las cuales durante el 2008 se comenzaron a profundizar en nuestro laboratorio, formando un consorcio con investigadores de otros países, con la iniciativa de formar una Red Temática. Cabe destacar que el tema es de significativo interés tanto para la Argentina, como para el resto de los países de América Latina, y Europa que finalmente forman parte de la “Red Iberoamericana para el Estudio del Control Biológico con TrV de Triatomíneos Transmisores de Chagas” (REDTrV: <http://www.redtrv.org>). Esta red integrada por 32 grupos de investigación de 16 países y 3 empresas, bajo un convenio con el CYTED que comenzó en el 2009 (<http://www.cytmed.org>) y tiene como objetivo desarrollar un nuevo sistema de control de los vectores transmisores de Chagas a través de un biopesticida basado en TrV.

TrV es uno de los patógenos mejor estudiados, principalmente en condiciones de laboratorio, siendo escasa la información sobre el sistema hospedador-parásito en la naturaleza.

El control biológico puede ser una alternativa válida en los programas de control de triatomíneos a largo plazo en las zonas endémicas de Argentina. Como ya hemos mencionado, la introducción o el incremento de la densidad de enemigos que naturalmente disminuyen las poblaciones de estos insectos,

puede lograr en el tiempo, la reducción del número de vectores a niveles que aseguren la interrupción de la transmisión de la enfermedad.



## **CAPÍTULO II**

### **DIVERSIDAD DE TrV EN TRIATOMINOS DE ARGENTINA**

#### **2.1- ANTECEDENTES**

El rango hospedador fisiológico en laboratorio, tanto por vía oral por medio de la ingesta de partículas de TrV, como por vía intrahemocélica por medio de inoculaciones de partículas de TrV, es mucho más amplio que el rango hospedador ecológico que son los hallazgos de triatominos en el campo con presencia de partículas de TrV.

En su tesis doctoral, el Dr. Muscio, observó insectos del insectario que morían de forma súbita luego de recibir alimento a repleción y luego de analizar estos insectos pudo identificar unas partículas al Microscopio Electrónico que eran muy similares a las que habían encontrado en triatominos provenientes del paraje Media Naranja de la Provincia de Córdoba. Así, en febrero de 1986, se cita por primera vez al único virus entomopatógeno hallado e identificado en triatominos hasta el presente (Muscio et al., 1987).

Posteriormente se estudió la incidencia de TrV en poblaciones de *T. infestans* de domicilios y peridomicilios en diferentes localidades de la zona endémica de Córdoba (Argentina), dando como resultado un porcentaje de infección de 1% a 10% (Muscio et al., 1997). Durante una prospección realizada durante el período 2002-2005 se encuentra a TrV nuevamente en poblaciones naturales de *T. infestans* en la provincia de Córdoba, y además en las provincias de San Luis, Mendoza, Tucumán, La Rioja, Santa Fe, Santiago del Estero y Salta. En la provincia de Chaco se halla *T. sordida* la cual es citada como la segunda especie observada en la naturaleza (Marti et al., 2009).

#### **2.2- MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **2.2.1- TRABAJO DE CAMPO**

Las colectas fueron procesadas a fines prácticos en dos grupos, triatominos silvestres y triatominos de domicilio y peridomicilio. Esto es debido a que número de ejemplares que se colectan en cada uno de estos ambientes

es muy variable y es diferente la manera que se utilizó para realizar su colecta (colectas activa y pasiva, ver 2.2.1.1. y 2.2.1.2). Por ende, los insectos fueron procesados de diferente manera si se trataba de poblaciones numerosas de *T. infestans* procedentes de domicilio o peridomicilio (pooles) o si se trataba de *T. infestans* u otra especie del ambiente silvestre (individuales) (ver 2.2.2.1).

#### **2.2.1.1- COLECTA DE TRIATOMINOS SILVESTRES**

Las colectas de triatominos silvestres se llevaron a cabo en las provincias de Chaco y La Rioja (Argentina). Ambas pertenecen al Dominio Chaqueño, dentro de la Región Neotropical, que abarca gran parte del territorio argentino (Fig. 2a y Fig. 2b).

En cada muestreo se realizaron capturas de triatominos en microhábitats que para la región chaqueña ya se habían descripto con anterioridad. Varias especies de triatominos (*T. delpontei*, *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. platensis*, etc.) fueron halladas en nidos de aves, refugios de mamíferos, cactáceas, bromeliáceas y cortezas de árboles (Wisnivesky et al., 1997). Estas capturas se realizaron tanto por búsqueda activa, empleando desalojante (tetrametrina 0,2%), como por búsqueda pasiva utilizando trampas de luz y trampas Noireau.



Fig. 2a: Paisajes de la Provincia de Chaco.



Fig. 2b: Paisajes de la Provincia de La Rioja.

### Áreas de muestreo

Durante el período 2008 a 2011 se realizaron las campañas de colectas de triatomos durante los meses con temperaturas más cálidas (primavera-verano) que son meses sumamente propicios para la expansión de las poblaciones de triatomos, favoreciendo de esta manera el desarrollo de enfermedades producidas por parásitos y patógenos. Durante estos años se realizaron 4 viajes a la provincia de Chaco y 3 viajes a la provincia de La Rioja (Fig. 2c). El área de muestreo en la provincia de Chaco y La Rioja, pertenecen a la gran región biogeográfica Neotropical; Dominio Chaqueño. Para las regiones fitogeográficas se sigue el criterio de Engler, modificado por Mattick, 1964 y para el caso de las regiones zoogeográficas, la clasificación clásica de Sclater y Wallace, con algunas modificaciones posteriores, hasta llegar a la de Darlington.

La provincia de Chaco comprende sectores de la denominada Provincia Chaqueña, una de las provincias de mayor volumen de vegetación. El clima es subtropical, con precipitaciones anuales de 450 mm y la temperatura media varía entre 13°C y 28°C, con máximas absolutas de 43°C. El tipo de vegetación predominante es el bosque xerófilo caducifolio, un estrato herbáceo de gramíneas y numerosas cactáceas y bromeliáceas terrestres. Pero hay también palmares, sabanas y estepas arbustivas halófilas. El paisaje se caracteriza por la presencia de *Schinopsis balansae* (quebracho colorado), por lo general asociados con *Aspidosperma quebracho* (quebracho blanco), *Caesalpinia paraguayensis* (guayacán), *Tabebuia avellanedae* (lapacho), *Cercidium praecox* (brea), *Prosopis kuntzei* (itin), *Zizyphus mistol* (mistol). También aparecen con frecuencia palmares, entre ellas, *Copernicia australis* y colonias de la palmera *Trithinax campestris*. Además bromelias y opuntias, entre otras.

La Provincia Chaqueña se encuentra muy alterada por la intensa explotación forestal y ganadera, donde en muchas zonas no solo ha desaparecido el bosque primitivo, sino también el estrato herbáceo, quedando algunos arbustos espinosos, bromeliáceas y cactáceas.

En cuanto a la fauna que habita la región, encontramos entre los marsupiales, la comadreja overa (*Didelphis azarae*) de amplia distribución, la comadreja colorada (*Lutreolina crassicaudata*) y varias marmosas. Además

hay zorros (*Cerdocyon* y *Dusicyon*) el aguará- guazú (*Chrysocyon*) uno de los animales más representativos de la zona, un coatí (*Nasua*), el hurón menor (*Galictis*) y el hurón mayor (*Eira*), el yaguareté (*Felis onca*), algunos monos como el aullador (*Alouatta caya*) que es otra de las especies típicas de la región, el miriquiná (*Aotus*) y el caí (*Cebus*). Hay muchos roedores: la rata nutria (*Holochilue brasiliensis*), ratas (*Scapteromys*, etc), tuco-tucos (*Ctenomys*), la vizcacha (*Lagostomus*), etc. También se encuentra el ciervo de los pantanos (*Blastocerus dichotomus*), el venado de las pampas (*Ozotocerus*) y dos especies de corzuelas (*Mazama*). Hay varios edentados como el pichiciego chaqueño (*Burmeisteria retusa*), el quirquincho bola o mataco (*Tolypeutes matacus*), el tatu carreta (*Priodontes giganteus*), el gigante de los armadillos cuyo número disminuye rápidamente, el peludo grande (*Euphractus*), la mulita grande (*Dasypus*) y el tatu de rabo molle (*Cabassous*), además están representados el oso hormiguero (*Myrmecophaga*), el oso melero (*Tamandua*) y el perezoso (*Bradypus*).

Hay citadas mas de 200 especies de aves en esta provincia; siendo las más representativas: las chuñas (*Chunga burmeisteri* y *Carioma cristata*), perdices del genero *Nothura*, la martineta (*Eudromia*), la charata (*Ortalis*), la pava del monte (*Penelope*), el jaribú (*Jaribu micteria*), garzas blancas (*Egretta*), hornero (*Furnarius cristata*), cotorras y loros (*Myiopsitta*, *Nandaryus*), carpinteros (*Chrysoptilun*). Varias especies de boas y ampalaguas. Cerca de 50 colubridos, además de dos especies de cascabel y yarará. La fauna de anfibios llega a 32 especies; de estas, dos son endémicas: la rana (*Leptodactylus laticeps*) y el escuerzo (*Ceratophrys pierotti*) (Cabrera y Willink, 1973).

La provincia de La Rioja pertenece a la Provincia del Monte que ocupa una gran extensión de las regiones más áridas de la Argentina. El clima es siempre seco y cálido en la porción septentrional y más fresco en la meridional. La precipitación varía de 80 a 250 mm anuales, mientras el promedio anual de temperatura oscila entre los 13 a 15,5 °C. A pesar de la gran extensión que abarca la Provincia de Monte, tanto la fisonomía de la vegetación como la composición florística son bastante homogéneas. Domina el matorral, muchas veces abierto, donde predominan zigofiláceas (*Larrea*, *Bulnesia* y *Plectrocarpa*), como las jarillas del género *Larrea*, rodajilla

(*Plectrocarpa rougessi*), matasebo (*Monttea aphylla*), el monte negro (*Bougainvillea spinosa*), la pichana (*Cassia aphylla*), la brea (*Cerdidium praecox*), la chilladora (*Chuquiraga erinacea*), el alpataco (*Prosopis alpataco*), retamo (*Bulnesia retama*), y muchas otras especies arbustivas.

En cuanto a la fauna, los mamíferos característicos son la comadreja overa (*Didelphis azareae*), el ratón de palo (*Marmosa pusilla*), murciélagos (*Histiotus*, *Myotis*, *Tadarida*, *Eumops*), hurones (*Lyncodon* y *Galictis*), zorros (*Dusicyon*), zorrinos (*Conepatus*), gato montés de las salinas (*Felis geoffroyi salinarum*), yaguarundi (*Felis yagouarundy*), el gato de los pajonales (*Felis pajeros*) y el puma (*Puma concolor*). Los roedores son numerosos: maras (*Dolichotis patagonum*), cuises (*Microcavia*), ratas, pericotes y ratones (*Reithrodon*, *Phyllotis*, *Eunemys*, etc). Entre los armadillos, el más típico y endémico de la familia es el pichiciego (*Chlamyphorus truncatus*); el mataco (*Tolypeutes matacus*), dos especies de peludos (*Chaetophractus villosus* y *Ch. vellerosus*) y el piche llorón (*Zaedyus pichiy*). En cuanto a las aves, encontramos perdices (*Nothoprocta cinerascens*) y martinetas (*Eudromia elegans*), el loro barranquero (*Cyanoliseus patagonum*), catas serranas (*Bolborhynchus aurifrons*), el gallito o corredora (*Teledromus fuscus*), monterito (*Poospiza ornata*) y otras. Hay varias especies de reptiles: la boa de las vizcacheras (*Constrictor constrictor*), la víbora de coral (*Micrurus*), la yarará (*Bothrops*) y algunas culebras; lagartijas, iguanas geckonidos y una tortuga terrestre, etc. Entre los batracios se pueden citar especies de *Leptodactylus*, *Pleurodema* y *Bufo* (Cabrera y Willink, 1973).





Fig. 2c: Mapa de la República Argentina exponiendo las zonas muestreadas de provincias de Chaco y La Rioja.

### **Métodos de captura**

#### Captura activa

Los ecotopos silvestres donde se realizaron las búsquedas se restringieron a nidos de aves (principalmente de furnánidos y psitácidos), cactáceas (cardones secos), bromeliáceas y cortezas de árboles.

En el caso de los nidos de aves, se llegó hasta el nido con la ayuda de una escalera metálica plegable de 6 metros de alto y ayudado con una varilla de aluminio para los nidos que superaban esa altura. Luego de bajar el nido para el desarme se utilizó una cubeta plástica blanca de 100 cm x 40 cm x 24 cm, y para los nidos extremadamente grandes se colocó debajo una lona plástica blanca de 1,5 x 4 m. Luego del desarme se extrajeron con guantes y pinzas cuidadosamente cada uno de los insectos (Fig. 2d).



Fig 2d: Arriba: Nido de Furnariidae: secuencia desde que se busca en el árbol hasta que se coloca en la cubeta plástica. Abajo izquierda: búsqueda de triatomínos en nidos de Psittacidae.

Cuando el lugar de búsqueda fueron las cactáceas, chaguales, bromeliáceas o cortezas de árboles, estas se movieron cuidadosamente y se buscaron los insectos con la ayuda de pinzas metálicas y desalojante cuando fue necesario (Fig. 2e).





Fig. 2e: Búsqueda de triatominos en ambiente silvestre. Arriba: paisaje mostrando cactáceas. Abajo izquierda: cortezas de árboles; a la derecha chaguales.

### Captura pasiva

Para este tipo de colectas se utilizaron dos tipos de trampas:

➤ **Trampas Noireau**

Se utilizaron 20 trampas que fueron expuestas durante toda la noche, tres días en cada zona de muestreo. En la provincia de Chaco, ambas zonas de muestreo se realizaron en la localidad de El Palmar (Palmar 1 y Palmar 2); mientras que en las provincias de La Rioja la zona de muestreo estuvo situada en dos localidades, Patquia Viejo y Salinas de Bustos. Estas trampas contenían un ratón adulto (macho o hembra) Balb/c, como cebo dentro de un recipiente plástico, y una malla metálica tapando la abertura del mismo. Alrededor del recipiente se colocó adhesivo externamente, para la captura de los triatominos, que en busca de su alimento quedaron adheridos al mismo (Noireau et al., 1999a; Abad-Franch et al., 2000) (Fig. 2f y 2g).



Figura 2f: Trampa Noireau colocadas entre piedras. Provincia de La Rioja.



Figura 2g: Preparación de Trampas Noireau para su posterior colocación.



Dentro del recipiente junto al ratón se colocó aserrín, alimento balanceado y un trozo de zanahoria para evitar la deshidratación del roedor, debido a las altas temperaturas.

En la provincia de chaco estas trampas se colocaron en dos zonas de la localidad de El Palmar. Se situaron en las pocas parcelas de monte virgen que quedan limitando las zonas de cultivo: entre bromelias, en árboles caídos, cercanos a cuevas de mamíferos.

En la provincia de La Rioja, las trampas se colocaron en dos zonas, una en la localidad de Patquia Viejo donde se colocaron asociadas a palmeras, tanto en la copa de las mismas como cerca del sustrato (Fig. 2g) y otras en la localidad de Salinas de Bustos que al ser tan distinta la fisonomía del lugar, se eligió una zona de piedras (Fig. 2f).

En ambas zonas las trampas fueron colocadas al resguardo, tanto de posibles predadores como de las radiaciones solares.

#### ➤ Trampas de luz

Se utilizaron 8 trampas de luz ubicadas cada 100 m, cubriendo una transecta de 800 m. Estas transectas fueron ubicadas en las mismas cuatro localidades (tres noches en cada localidad) en donde se ubicaron las trampas Noireau. Se colocaron durante el ocaso, en un período de 4 horas, durante 6 noches para cada una de las provincias, en cada viaje realizado (fig. 2h).



Figura 2h: Esquema de la organización de las trampas de luz en el campo.

T.L= Trampa de Luz; G.E= Grupo Electrónico.

Cada trampa de luz se compone de una varilla de hierro en forma de “ele” de 1,30 m de altura que sostiene en su extremo una lámpara de 100 watts de potencia. Los insectos al ser atraídos por la luz caían en un embudo de 60 cm de diámetro sostenido a la varilla con un aro de hierro y apoyado sobre un balde de 8 litros (Fig. 2i). La energía para las lamparitas, fue suministrada por un grupo electrógeno naftero portátil Logus Gg3300.

Pasadas las cuatro horas, se procedió a la recolección de los insectos. Esto se realizó buscando en cada balde plástico, los triatominos, descartando en otros recipientes el resto de los artrópodos que cayeron atraídos por la luz. Los triatominos atrapados se colocaron en los recipientes como en el resto de las capturas y se transportaron al laboratorio.



Figura 2i: Trampa de Luz. Provincia de La Rioja.

#### **2.2.1.2- COLECTA DE TRIATOMINOS EN DOMICILIO Y PERIDOMICILIO**

Las colectas de triatominos de domicilio y peridomicilio se llevaron a cabo en las provincias argentinas de Chaco, La Rioja, Santa Fe y Córdoba, durante el período 2008-2011.

En cada muestreo se realizaron capturas exclusivamente por búsqueda activa, en los domicilios y en el peridomicilio principalmente. EL peridomicilio se define como el área que circunda a la vivienda humana y en el cual el hombre desarrolla sus actividades domésticas y mini productivas. Se incluyeron bajo este concepto todos los depósitos, corrales de animales, flora, etc., los cuales podrían actuar como paso previo a la colonización del domicilio

por triatominos silvestres. Estas estructuras de alambres, palos, ladrillos, plásticos, entre otras, resguardan no solo animales de cría sino también animales domésticos (Canale et al., 2000; Cecere et al., 1997; Bos 1988) (Fig. 2j).





Figura 2j: Lugares de colecta en el peridomicilio. Provincia de Chaco (arriba): corrales de cabras y nidos de palomas (arriba, derecha). Provincia de La Rioja (abajo): corrales de cabras de distintos materiales.

### Áreas de muestreo

Durante el período 2008 a 2010 se realizaron los muestreos en las provincias de Chaco, La Rioja, Santa Fe y Córdoba. En el caso de las provincias Chaco y La Rioja, durante los días que se realizaron las colectas de triatomos silvestres, se obtuvieron muestras de domicilio y peridomicilio cercanos. Se colectaron además triatomos de ambientes domiciliario y peridomiciliario en localidades de Santa Fe y Córdoba.

La especie mayormente hallada en estos ambientes fue *Triatoma infestans*, que es una especie domiciliaria y su hábitat más importante son los ecotopos creados o modificados por el hombre. En la zona donde se realizaron los muestreos, generalmente los ranchos son de adobe con techos de chapa, plásticos o paja, con paredes de barro o de ladrillos mal revocados o sin revocar, que presentan grietas o quebraduras dejando lugares propicios para que se alojen los triatomos, así como en muebles, camas, cajas, pilas de ropa en desuso, etc. De esta forma, se asocia a los triatomos de hábitos

domiciliarios a condiciones sociales higiénicas deficientes, aunque también se encuentran en viviendas de buena calidad con malas condiciones de higiene.

Debido a que el peridomicilio es una pieza fundamental en el proceso de adaptación al hábitat humano, ya que muchas especies lo utilizan como una transición entre el hábitat silvestre y doméstico, los triatominos representan un riesgo epidemiológico debido a la capacidad potencial que tienen para reemplazar a los vectores domiciliarios ocupando de este modo el nicho ecológico dejado por estos después de su eliminación (Wisnivesky-Colli et al., 1993). Otros autores señalan la importancia del peridomicilio en la reinfestación de las viviendas, luego de ser eliminadas las especies domiciliarias (Cecere et al., 1996; Cecere et al., 1997; Zeledon y Rabinovich, 1981). Así, el peridomicilio constituye para estos triatominos un hábitat favorable ya que este ambiente posee una disponibilidad y acceso a la fuente alimentaria mucho mayor que el ambiente selvático. El primer paso en este proceso de adaptación domiciliaria es cuando especies selváticas comienzan a usar como hábitat frecuente el peridomicilio humano y por lo tanto los animales que se encuentran en él como fuente alimentaria. Perros, gatos y otros mamíferos como cabras, ovejas, conejos, cerdos, al ser fuente de alimentación de los triatominos infectados con *T. cruzi*, se constituyen en reservorios hospederos del parásito. A estos se pueden agregar múridos sinantrópicos, comadrejas, zorrinos, hurones, murciélagos y el propio hombre cuando contacta con estos vectores, a reposar por ejemplo, en galpones. En nuestras regiones de muestreo, se citan al perro, la zarigüeya y los roedores como los probables hospederos reservorios más importantes dentro del ciclo peridomiciliario (Diosque et al., 2003; 2004). Además de otros estudios realizados en nuestro país que han demostrado la importancia del perro como reservorio intradomiciliar en la transmisión del parásito por *T. infestans* (Gürtler et al., 1998).

## **Métodos de captura**

### Captura activa

Las capturas se realizaron en viviendas y alrededores. Se revisaron principalmente, los lugares donde había restos de materia fecal de triatominos, fácilmente reconocibles por su color y materialidad. Se buscó



exhaustivamente en las grietas de adobe, rajaduras de las paredes, espacios entre materiales en desuso, y otros ambientes similares. Cuando fue necesario se utilizó un agente desalojante en aerosol. Esto es debido a que hay lugares donde es difícil el acceso a estos insectos, dificultándose su captura y siendo necesaria la ayuda de este irritante para que salgan de sus refugios (Fig. 2k).

Así, se buscaron triatominos cerca de las casas, en corrales de cabras, mulas, conejos y cerdos; gallineros, palomares, depósitos, pilas de leña y árboles donde duermen gallinas. Principalmente se recolectó en gallineros, previo desarme de los mismos, ya que estos ambientes poseen poblaciones numerosas de insectos en un área restringida (Marti, 2005). Las gallinas tienen especial importancia como hospedadores de triatominos, si bien las aves son refractarias a la infección con *T. cruzi* permiten un estado nutricional óptimo de las poblaciones de triatominos y mantienen un elevado número de individuos. López et al., 1999, detalla en su estudio llevado a cabo en dos regiones endémicas de la región central de Argentina, en la provincia de Santiago del Estero, municipio de Atamisqui, y en el municipio de Quilino en la provincia de Córdoba, que los gallineros más próximos a la vivienda humana son los más riesgosos, no solo por el aporte de los triatominos al domicilio, sino por la movilización de estos insectos para alimentarse sobre personas que duermen cerca. En los triatominos de hábitat peridomiciliario más próximos a las viviendas se registró un aumento de la ingesta sobre humanos, mientras que en gallineros alejados a más de 12 metros de la vivienda no se detectaron en los triatominos ingestas sobre humanos

De este modo, al evidenciarse la presencia materia fecal, mudas o huevos de los insectos, se procedió a desarmarlos con mucho cuidado, golpeando los objetos sobre una lona plástica blanca o una cubeta plástica blanca de 100 cm x 40 cm x 24 cm, dependiendo esto del tamaño de los objetos a examinar. Ambos recipientes se colocaron en el piso del lugar y los insectos que caían se capturaron con pinzas metálicas entomológicas. En cada sitio se recolectó la totalidad de los insectos hallados vivos, como así también los individuos hallados muertos e intactos.





Figura 2k: Principales lugares donde se realizó la búsqueda de triatominos en peridomicilio.

En todos los casos, se tratase de insectos de domicilio-peridomicilio o del ambiente silvestre, los triatominos se colocaron en recipientes plásticos individuales para evitar cualquier tipo de contaminación/alteración, se rotularon debidamente, asignando localidad, sitio específico de recolección, fecha y número de ejemplares. Finalmente fueron transportados al laboratorio para su posterior análisis.

### **Triatominos colectados previamente**

Material conservado en la colección del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE)

Se utilizaron para este trabajo diversas muestras debidamente conservadas, que se habían recolectado previamente al comienzo de esta tesis por nuestro grupo de trabajo, perteneciente al laboratorio de triatomínos del CEPAVE. Estas muestras fueron tomadas de las provincias de Buenos Aires, Chaco, Formosa, La Rioja, Mendoza, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán. La metodología utilizada para la búsqueda de los triatomínos fue la misma que se describió anteriormente.

#### Material conservado en la colección de otros centros de investigación

En varias oportunidades fueron recibidos triatomínos pertenecientes a diferentes localidades de las provincias de Chaco y Córdoba. En el caso de los insectos provenientes de Chaco fueron enviados por Investigadores de la Unidad de Epidemiología Molecular, Instituto de Patología Experimental, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta, CONICET. Salta, Argentina y los insectos que provenían de Córdoba fueron enviados desde el Centro de Referencia de Vectores, Coordinación Nacional de Control de Vectores. Santa María de Punilla, Córdoba, Argentina.

#### **2.2.1.3- MANTENIMIENTO EN EL LABORATORIO DE LOS TRIATOMINOS**

Los insectos que se colectaron en el campo, se trasladaron al Insectario del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, CEPAVE (UNLP-CCT-CONICET).

Todos los triatomínos se mantuvieron en un ambiente de 1,20m de ancho x 2,40m de largo x 3m de altura, con estanterías verticales donde se colocaron los recipientes plásticos con los insectos recolectados. Estos fueron preservados individualmente para evitar la posible transmisión entre los mismos, con una tela de nylon en la abertura del recipiente y con papeles doblados y colocados verticalmente en su interior. El insectario fue mantenido a 28°C +/- 1°C, 60% +/- 5% de humedad relativa y un fotoperíodo de 12:12 (L-O).

El mantenimiento de las colonias de triatomínos hasta realizar la extracción de materia fecal fue realizado mediante un alimentador artificial con sangre humana (obtenida del Instituto de Hemoterapia de la Provincia de Buenos Aires) diseñado en nuestro laboratorio.

## **2.2.2- TRABAJO DE LABORATORIO**

### **2.2.2.1- METODOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y EXTRACCIÓN DE MATERIA FECAL DE LOS TRIATOMINOS**

#### **Identificación**

Los ejemplares fueron identificados a nivel específico, utilizando las claves taxonómicas de Lent y Wigodzensky (1979). Los triatomos fueron examinados individualmente, observándose a ojo desnudo y bajo microscopio estereoscópico para detectar algún tipo de alteración morfológica o parálisis en las extremidades.

En los casos en los cuales se dificultó la determinación en sus estadios ninfales, los ejemplares fueron alimentados con un alimentador artificial hasta alcanzar el estado adulto.

#### **Métodos y procesamiento**

Los triatomos fueron procesados de diferente manera de acuerdo al ambiente:

- T. infestans* de domicilio o peridomicilio
- Triatomos de ambientes silvestres

Esto es debido al número de ejemplares que se colectaron en cada ambiente, en el caso de los hallados en los viajes. Generalmente las capturas de *T. infestans* en domicilio y peridomicilio fueron numerosas, mientras que la captura de ejemplares de triatomos silvestres en general varió entre 1, 2 o 3 individuos por muestra. Del mismo modo se evaluó a los insectos que habían sido capturados previamente como los recibidos de otros centros, aunque en estos casos se trató de triatomos de ambientes domiciliarios y peridomiciliarios.

#### **Extracción de materia fecal**

El procesamiento del material de todos los triatomos se inició inmovilizando al insecto con la ayuda de pinzas metálicas y presionando la región abdominal para obtener la materia fecal. Estas fueron resuspendidas en 200 µl de PBS y mantenidas en microtubos (Marti et al., 2008).

Por lo expuesto anteriormente, los insectos se analizaron como se

detalla a continuación:

- Triatominos silvestres: se extrajo la materia fecal y se analizaron individualmente; un ejemplar por tubo Eppendorf y así se prosiguió con su tratamiento.
- *T. infestans* de domicilio y peridomicilio: se procedió de la misma manera que el punto anterior, con la diferencia que al encontrarnos con más cantidad de insectos, se realizaron pooles. Estos constaron de 10 a 15 individuos por tubo Eppendorf y así se prosiguió como en el caso de los tratados individualmente.

### **2.2.2.2- METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE TrV**

Para la búsqueda y procesamiento del virus hallado en los triatominos de Argentina, se utilizaron las técnicas y metodologías descritas por Adams y Bonami (1991); Evans y Shapiro (1997), Miller y Ball (1998), Marti (2005; 2008), Becnel (1997) y Rozas-Dennis et al., (2000).

#### **Elaboración del control positivo**

La purificación de partículas virales se realizó con ejemplares de la colonia de *T. infestans* infectada con TrV. El TrV purificado se utilizó como control positivo para todas las técnicas de diagnóstico. Desde el año 2002, se procedió a la instalación y mantenimiento de una colonia de *T. infestans* infectada con TrV en nuestro laboratorio del CEPAVE, de donde se tomaron distintas muestras de materia fecal para proceder a la purificación viral.

#### Clarificado de los insectos

Se utilizaron lotes de 30 insectos, los cuales fueron macerados en un mortero de cerámica con 10 ml de solución tamponada NMT (0,01M NaCl, 0,001M MgCl<sub>2</sub> y 0,04M Tris HCl pH 7,4). Luego el macerado se filtró a través de un tamiz de nylon. El clarificado se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman rotor 40,2 Ti a 14.000 rpm (20.000 *g*) a 4°C durante 10 min.

#### Purificación viral mediante gradientes de sacarosa

La purificación se llevó a cabo según metodología descrita por Marti et al., 2008. El producto de la clarificación (sobrenadante) se centrifugó durante 3h en una ultracentrífuga Beckman rotor 70 Ti a 44.000 rpm (140.000 *g*) a

4°C llegándose a obtener un pellet conteniendo restos celulares y TrV. El pellet se resuspendió en una solución tamponada NMT y se sembró en un gradiente continuo de sacarosa 10%-30% (P/V) preparado en la misma solución tamponada. El gradiente se centrifugó a 22.000 rpm (64.000 *g*) en un rotor Beckman SW 28.1 durante 3h a 4°C. Luego de la centrifugación se recolectaron del gradiente, fracciones de 2 ml aproximadamente, por medio de pipetas y luego se midió la absorbancia de cada fracción a 260 nm con un espectrofotómetro. El pico de la lectura a 260 nm correspondió a las partículas de TrV purificado y se utilizó para determinar la masa aproximada de virus purificado. Las fracciones seleccionadas se diluyeron en una solución tamponada salina NMT y se centrifugaron finalmente durante 2 hs a 44.000 *g*, a 4°C en un rotor de 80 Ti Beckman. Los sedimentos obtenidos se resuspendieron en 1 ml de una solución tamponada TE (-Tris EDTA- 1mM EDTA, 10mM Tris-ClH pH 7,4). De esta manera, el virus purificado se fraccionó en alícuotas de 0,24 ml en tubos Eppendorf y se conservó a -20 °C y a -70 °C (Fig. 21).

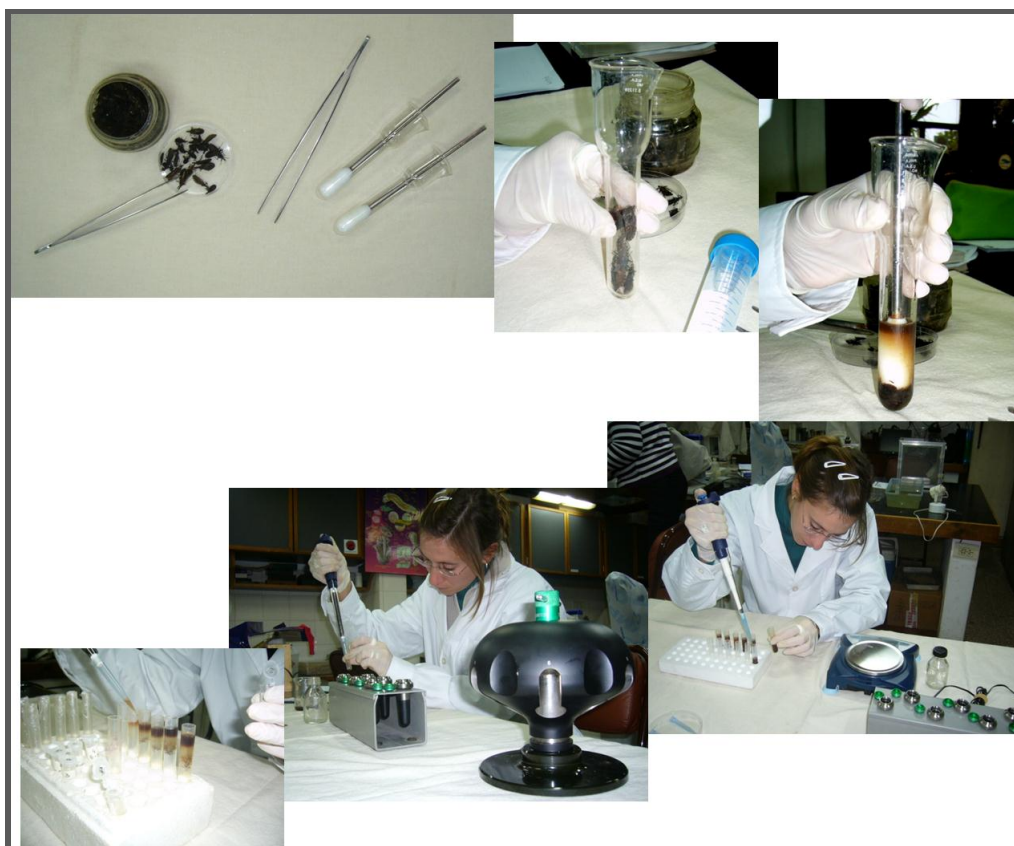


Figura 21: Detalle de los pasos de la purificación viral para obtención del control positivo.

Técnica de electroforesis en SDS-PAGE para evaluación de partículas virales purificadas

Para confirmar su identidad y grado de pureza, se procedió a analizar las proteínas estructurales a partir de las partículas virales purificadas en el paso previo por medio de la electroforesis en SDS-PAGE. Para esta técnica se utilizó una solución stock de 30-0,8% de acrilamida-bisacrilamida. Se utilizaron dos concentraciones para la preparación de los geles: 10% y 12,5%. Se empleó un sistema de tampón discontinuo que desencadena un gradiente de voltaje para lo que se utilizó una solución tamponada Tris-ClH pH 8,8 y 6,8 y una solución tamponada de reservorio pH 8, básicamente de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Las cantidades de persulfato de amonio (APS), tetra metil etilen diamina (TEMED) y dodecil sulfato de sodio (SDS), se ajustaron para el tiempo óptimo de polimerización según las concentraciones de acril-bisacrilamida:

Gel de corrida	10%	12,5%
Acril - bisacrilamida (30-0,8%)	10 ml	12,5 ml
Tris ClH (0,4M) pH 8,8	7,4ml	7,4 ml
Agua destilada	12 ml	9,4 ml
TEMED	0,02 ml	0,02 ml
SDS (10%)	0,3 ml	0,3 ml
APS (1%)	0,2 ml	0,2 ml

El gel concentrador o stacking, donde se sembró la muestra, fue utilizado al 5% con las siguientes composiciones:

Acril- Bisacrilamida (30-0,8%)	0,66 ml
Tris ClH (0,5M) pH 6,8	1,25 ml
Agua destilada	3 ml
TEMED	0,005 ml
SDS (10%)	0,05 ml
APS (1%)	0,075 ml

Las muestras fueron procesadas en tampón de muestra para trabajar en condiciones no reductoras (NR):

Tampón de muestra	NR
Tris ClH (0,5M) pH 6,8	0,250 ml
SDS (10%)	0,400 ml
Glicerol	0,400 ml
Agua destilada	0,950 ml
Azul de bromofenol	0,020 ml

Para la preparación de las muestras se colocaron aproximadamente 10 µg de TrV purificado y 30 µl de tampón muestra en un tubo Eppendorf que se colocó a baño maría (100°C) durante 5 min (Muscio et al. 1988). Como marcador de peso molecular se utilizó un producto comercial (Pharmacia) que fue resuspendido en el mismo tampón y que da seis bandas diferentes de pesos moleculares: 94 kD, 67 kD, 43 kD, 30 kD, 20,1 kD y 14,4 kD. Se sembraron 30 µl de muestra y 5 µl de marcador de peso molecular (PM) en las placas de 90 x 100 x 1 mm. Las condiciones de corrida se estandarizaron a 100V durante 2h por placa y el buffer de corrida utilizado fue: Tris 25 mM, glicina 191 mM, SDS 1%. La tinción de los geles fue realizada con azul brillante de Coomassie que detecta 0,2 a 1 µg de proteína (Sambrook et al., 1989). Esta solución colorante se dejó actuar 4 horas a temperatura ambiente (TA); los geles se decoloraron en agitación durante 12 horas como mínimo en una solución metanol ácido (30% metanol, 10% ácido acético glacial).

Las soluciones stock para preparar los geles de acrilamida fueron las siguientes:

1. Solución Acrilamida-Bisacrilamida: Acrilamida 30g; Bis acrilamida 0,8g; Agua CSP 100ml.
2. Buffer Tris-HCl 1,5M pH 8,8: Tris 18,15g; HCl para llevar a pH 8,8; Agua CSP 100ml.
3. Buffer Tris-HCl 0,5M pH 6,8: Tris 3g; HCl para llevar a pH 6,8; Agua CSP 100ml.
4. Persulfato de Amonio al 1%: 0,05g de APS en 0,5ml de agua.

5. Buffer de corrida 10x: Tris 30,2g; Glicina 144g; Agua CSP 1000ml.
6. Buffer de corrida 1x: 100ml buffer de corrida 10x mas 10ml SDS 10%, Agua CSP 1000ml.
7. Buffer de carga: Tris-HCl 0,5M pH 6,6 (250ul); SDS 10% (400ul); Glicerol (400ul); Azul de Bromofenol 0,1% p/v (20ul); Agua (850ul)
8. Solución de tñido: Azul Brillante de Coomasie 0,1g; Metanol 41,7ml; Acido acético glacial 16,6ml; Agua 41,7ml.
9. Solución de destñido: Metanol 300ml; Acido acético 100ml; Agua 600ml.

### **Detección, aislamiento e identificación**

#### Extracción de ARN

La técnica de extracción del ARN se llevó a cabo a partir de la materia fecal de los triatominos analizados con el método de extracción fenólica con Trizol (Invitrogen). Se mezclaron 50 µl de solución de materia fecal con 300 µl de Trizol. Se vortereó 15 seg y se dejó incubando 5 min. Luego se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm durante 2 min a 4°C. Posteriormente se adicionaron 60 µl de cloroformo y se vortereó 15 seg. Se dejó incubar a TA por 2 a 3 min observándose dos fases. Se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm 15 min a 4°C y se trasvasó la fase acuosa superior (aproximadamente 200 µl) a un tubo de microcentrifuga nuevo con 150 µl de isopropanol. Se invirtió cinco veces y se dejó incubar a TA 10 min. Se centrifugó a 12.000 rpm 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante con cuidado. Se lavó el precipitado con 300 µl de etanol 70%, se procedió a centrifugar a 7.500 rpm, 5 min a 4°C y se descartó el alcohol. Este procedimiento se repitió dos veces. Luego se centrifugó 15 seg y el pellet se desecó aproximadamente 10 min a 37°C. Se resuspendió el ARN viral en 15 µl de agua libre de nucleasas.

Se utilizaron controles positivos a partir del virus purificado preparado anteriormente.

#### Técnica de RT- PCR

Se define a esta técnica, como la amplificación enzimática selectiva de



las secuencias de ADN o ARN, flanqueadas por los dos oligos cebadores o “primers” que hibridan con las cadenas opuestas de la secuencia de interés. El ácido nucleico presente en la muestra se desnaturaliza a altas temperaturas y luego los cebadores se hibridan a las cadenas en forma complementaria, produciendo la síntesis de nuevas cadenas complementarias al ADN por la acción de la enzima polimerasa. Durante cada ciclo programado, cada cadena de ADN sirve de molde al ciclo siguiente, de manera de obtener grandes cantidades de ADN que se visualiza en geles. En el caso de TrV, al ser virus ARN, se realizó previamente una transcripción reversa.

Se utilizó la técnica de RT-PCR en un solo paso. Para la obtención del ADNc se procedió a la utilización del Kit One Step RT-PCR (QIAGEN, USA). El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta su empleo. Los primers utilizados fueron los descriptos por el Dr. Marti (Marti et al., 2008):

TrV 1 a 5´TCAAACTAACTATCATCTGG 3´ (nt 7427-7448)

TrV 1 b 5´ TTCAGCCTTATTCCTCCCCC 3´ (nt 8240-8258)

Para amplificar el fragmento de interés, se llevaron a cabo cada una de las reacciones a un volumen final de 20 µl. Los volúmenes y concentraciones finales de los reactivos usados se indican en la siguiente tabla para un total de 15-16 muestras. La reacción consistió en 5 µl de cada ARN y 15 µl de la mezcla de RT-PCR:

REACTIVO	CANTIDADES (µl)
Agua libre de nucleasas	150
Buffer de RT-PCR	50
Mezcla de dNTP	10
Cebador 1°	15
Cebador 1b	15
Mezcla de enzimas de RT-PCR	7
RNAsin	1

Las reacciones de PCR se realizaron en equipo Eppendorf Mastercycler Gradient. El ciclado utilizado fue el propuesto por Marti (Marti et al., 2008) y

consistió en un primer paso de retrotranscripción a partir del ARN, de 35 min a 50° C; un paso de desnaturalización de 15 min a 95°C y luego 35 ciclos como se indica a continuación:

Desnaturalización: 50 seg a 94°C

Hibridación: 50 seg a 48°C

Elongación o extensión: 1 min 30 seg a 72°C

Por último se realizó una extensión final de 10 min a 72°C.

Las reacciones de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,5 %, utilizando TBE 1X (Tris Base 89 mM, Acido Bórico 89 mM y 2 mM EDTA) como buffer de corrida. Como marcador de pares de bases se empleó el 100bp DNA Ladder (Promega). Los geles se sometieron a un voltaje de 100V por un período de tiempo acorde al fragmento amplificado y utilizando para ello el frente de corrida presente en el buffer de carga. Los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (0,5 µg/ml) luego de la corrida y se visualizó el resultado bajo transiluminador de luz UV.

#### Diseño de primers

Con el objetivo de secuenciar el ORF2 completo de las materias fecales positivas a la RT-PCR diagnóstica y evaluar diferencias o similitudes de secuencias de TrV entre especies de triatominos, se diseñaron 3 nuevos pares de primers específicos para los genes que codifican para las proteínas de la cápside: VP2 a VP4; VP4 a VP3 y VP1 del ORF2. La primer secuencia de primers abarca parte de la Región Intergénica (RI) y la última abarca parte de la región 3´.

Se realizó un diseño preliminar utilizando el programa DNAMAN (Lynnon Biosoft. Copyright 1994-1999). Los diseños de los cebadores se basaron en la secuencia de la cepa de referencia AF178440, disponible en el GenBank (Czibener et al., 2000). Como molde se utilizó ARN de virus purificado perteneciente a la cepa proveniente del insectario del CEPAVE, TIN1 (HM044313), con la metodología descrita en el apartado 2.2.2.2.

Los parámetros de diseño de cada uno de los cebadores fueron los siguientes:

1. Longitud entre 18 y 24 pares de bases (pb).

2. Contenido de G+C  $\geq$  60%.
3. Temperatura de hibridación  $\geq$  54°C.
4. Alta compatibilidad entre el par de cebadores y entre el mismo cebador.

De todos los resultados obtenidos con el programa DNAMAN, se escogió el par de cebadores que permitiera obtener cada uno de los genes de interés.

#### Purificación y cuantificación

Se purificaron los fragmentos amplificados por PCR empleando el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), y/o kit de purificación AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, China) siguiendo los protocolos de los fabricantes. Otra variante utilizada que permitió una mejor recuperación de los productos de PCR fue el uso de Polietilenglicol y Acetato de sodio como precipitantes (50-50). Los productos así purificados fueron cuantificados en geles de agarosa empleando el MassRuler™ DNA Ladder, low range, Reddy-to-use (Fermentas) como patrón de referencia. Cada una de las bandas de este marcador posee una cantidad de ADN cuantificada y tabulada, por lo que la cuantificación de los productos de interés fue realizada en base a la comparación de intensidad de la banda incógnita con las bandas presentes en el marcador. La purificación de los productos de PCR de cada sector amplificado, se realizó con el objeto de realizar la secuenciación directa o bien en algunos casos, para ser clonados en vectores bacterianos y posteriormente ser secuenciados. En este último caso, se logra obtener mayor cantidad de producto para su secuencia, pero no todos los secuenciadores aceptan productos de plásmidos. Por esta razón, las primeras secuencias de TrV fueron clonadas y las últimas solo secuenciadas en forma directa.

#### ➤ Clonado del producto de PCR en vector bacteriano

Los productos de PCR fueron clonados al vector de clonado pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) siguiendo los manuales de procedimiento del fabricante. Para el clonado se utilizó una proporción molar de 3:1 de inserto: vector. Teniendo en cuenta un tamaño de 832 pb teóricas y una concentración

provista por el fabricante de 50 ng/ml del vector pGEM-T, se empleó la siguiente fórmula para el cálculo de la masa de inserto a utilizar:

$$[(\text{ngvector} \times \text{Kbinserto}) \div \text{Kbvector}] \times \text{proporcion molar (inserto} \div \text{vector)} = \text{nginserto}$$

Con la concentración determinada de la cantidad de inserto a utilizar, se procedió a la preparación de la siguiente mezcla de ligación:

REACTIVO	CANTIDADES (ul)
Buffer 2X Ligación Rápida de la T4 ADN Ligasa	5
Vector pGEM-T Easy (50ng)	1
Producto de PCR	"X"
4 ADN Ligasa (3U/ul)	1
Agua libre de nucleasas: CSP	10

La reacción se mezcló por pipeteo. De acuerdo a las recomendaciones del fabricante, se incubó 1 h a TA y toda la noche a 4°C.

#### ✓ Competencia de las células

Con el objetivo de obtener células permeables al vector de clonado se realizó la competencia de las mismas. Se utilizaron las células Top10. Para la competencia de las células se plaquearon las mismas por el método de estría por agotamiento utilizando placas LB con 25 ul/ml de Kanamicina. Una colonia aislada se picó y cultivó toda la noche en medio LB con antibiótico. A partir de este cultivo se realizó una dilución 1/100 y se incubó a 37°C hasta obtener la fase log de crecimiento (DO=0,6). En ese momento se centrifugó en cultivo a 3000 rpm por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 2ml de MgCl<sub>2</sub> 100mM y se centrifugó en las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1ml de MgCl<sub>2</sub> 100mM incubando 15 min en hielo. La mezcla se centrifugó, descartó el sobrenadante y agregó 1ml de CaCl<sub>2</sub> 100mM. Se incubaron las células 15 min en hielo y nuevamente se centrifugó descartando el sobrenadante. Se resuspendieron las células en una solución mixta de 1ml de MgCl<sub>2</sub> 100mM y 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 100mM y se incubaron 15 min en hielo. Se añadió 20% de glicerol shock a las células, fraccionando 100ul de las células competentes en tubos de microcentrífuga los

cuales se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

✓ Transformación

Se transformaron células competentes Top10 con 3 µl del producto de ligación. Se mezcló por inversión y se incubaron en hielo durante 10 min. Luego, 90 seg a 42°C a baño maría y por último se incubó 10 min en hielo nuevamente. Luego se agregaron 900ul de medio SOC y se incubó el tubo con agitación (150 rpm) durante una hora a 37°C. Finalizada la incubación, se sembraron 100 µl de cada transformación en placas de agar Luria Bertani (LB) (Tryptona 10g/l; Extracto de levadura 5g/l; NaCl 5g/l; Agar 15g/l), con el agregado de 100 µg/ml de Ampicilina, 0,5mM isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) y 80ug/ml de X-Gal. Las placas se incubaron 24 horas a 37°C y se seleccionaron las colonias blancas para su posterior evaluación.

✓ Aislamiento del plásmido con el fragmento de interés: minipreps

La miniprep es la extracción de ADN de naturaleza plasmídica de un cultivo bacteriano. Para ello, a partir de cada colonia blanca aislada se hizo crecer un cultivo líquido en medio LB con 100 µg/ml de Ampicilina en agitación durante toda la noche a 37°C. El cultivo se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado bacteriano fue resuspendido en 100 µl de solución P1, agitando vigorosamente en vórtex. Se agregaron 200 µl de solución P2, se mezcló por inversión y luego de un reposo en hielo de 5 min, se adicionaron 150 µl de solución P3 fría. Se mezcló por inversión y se dejó en hielo por 5 min. Se centrifugó a 15000 rpm a 4°C durante 12 min y el sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo de microcentrífuga. Se adicionaron 1,5 volúmenes de isopropanol frío y se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con un volumen igual de etanol 70%, se centrifugó por 5 min y se descartó el sobrenadante. Se desecó y por último se resuspendió el ADN plasmídico en 20-30 µl de agua estéril libre de nucleasas (Promega). Se utilizó también el kit comercial Wizard Plus SV Minipreps –DNA Purification System- (Promega, Madison, Wiscosin. USA) siguiendo el protocolo del fabricante.

Las soluciones empleadas en esta técnica fueron las siguientes:

- SOLUCIÓN P1: 50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA pH= 8.0.
- SOLUCIÓN P2: 0,2 M NaOH; 1% SDS. Esta solución se prepara en el momento de uso a partir de soluciones madre de 0,4M NaOH y 2% SDS.
- SOLUCIÓN P3: 3M de Acetato de Potasio (Kac) pH= 4,8.

✓ PCR con primers del vector de clonado

Luego de realizar minipreps se realizaron reacciones de PCR para verificar la correcta inserción del fragmento de interés en el vector de clonado, utilizando para ello los siguientes primers:

T7 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG G 3'

SP6 5' GAT TTA GGT GAC ACT ATA G 3'

Las cantidades utilizadas para la realización de la PCR fueron las siguientes:

REACTIVO	CANTIDAD (ul)
Master Mix	10
Cebador	0,5
Cebador	0,5
Agua	7
Muestras	2

El programa utilizado fue el que se detalla a continuación:

TEMPERATURA	TIEMPO (min)
94	2
94	1*
55	1*
72	1*
*25 ciclos	

✓ Glicerol stock

Todas las colonias de interés en este trabajo se almacenaron en glicerol. Partes iguales del cultivo líquido de la colonia de interés se mezclaron con una solución estéril de glicerol al 80%. Se agitó en vórtex y se guardó a -70°C hasta su posterior empleo. Para la reactivación de la colonia almacenada, se tomó un inóculo del glicerol stock con ansa anillo y se resuspendió en medio de crecimiento con los antibióticos adecuados.

Secuenciación, alineamiento y árboles filogenéticos

➤ Secuenciación de los productos de PCR-secuenciación del producto del clonado

Los productos clonados en vectores rápidos (pGEM-T) o los productos de PCR se purificaron como se describió en párrafos anteriores y se enviaron a secuenciar: se llevó a cabo por el método de Dye-Terminator en el IGEVET, Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Nacional de La Plata y en la Unidad de Genómica, Instituto de Biotecnología, CICVyA - CNIA - INTA, respectivamente.

➤ Alineamientos de las secuencias obtenidas

La identidad de secuencias se analizó por comparación de genes conocidos de las secuencias públicas de las bases de datos disponibles (NCBI). Las secuencias fueron analizadas utilizando la versión de software 5 BioEdit (Hall, 1999). Se utilizó la secuencia de referencia AF178440 y la cepa TIN1. El análisis de homologías se realizó con el programa BLASTN (BLASTN. National Center for Biotechnology Information).

Las secuencias fueron alineadas con el programa MEGA Version 4.0 usando el algoritmo ClustalW. Las distancias de las secuencias fueron calculadas con el programa DNASTar (Tamura et al., 2007). Los árboles filogenéticos de las secuencias de las proteínas de la cápside fueron construidos por el método de neighbor-joining (NJ) utilizando el programa MEGA con un bootstrap de 1000 réplicas. Las distancias se calcularon con el método de Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2007).

**Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Una gota de solución de TrV purificado para su uso como control positivo y una gota de cada materia fecal positiva a TrV por RT-PCR fueron corroboradas por ME. Para aquellos resultados negativos por RT-PCR, se seleccionaron al azar algunas para su observación. Se colocaron en una grilla con membrana de colodión y se la dejó absorber durante 7 min, retirando el excedente. A continuación, una gota de ácido fosfotúngstico fue colocada sobre la grilla e incubada durante 40 seg. Finalmente, la grilla fue secada unos minutos y observada en el microscopio electrónico. El microscopio electrónico utilizado pertenece al Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Nacional de La Plata (microscopio electrónico de transmisión Jeol JME 1200 EX II).

**2.3- RESULTADOS**

Durante este trabajo de tesis, se efectuaron recolecciones de triatomíneos en 10 provincias de la Argentina desde agosto de 2008 hasta febrero de 2011 (Fig. 2m). Las colectas se realizaron en los ambientes silvestres, de domicilio y peridomicilio. Asimismo fueron analizados triatomíneos provenientes de otros centros de referencia como así también fueron considerados insectos de nuestro laboratorio debidamente conservados.



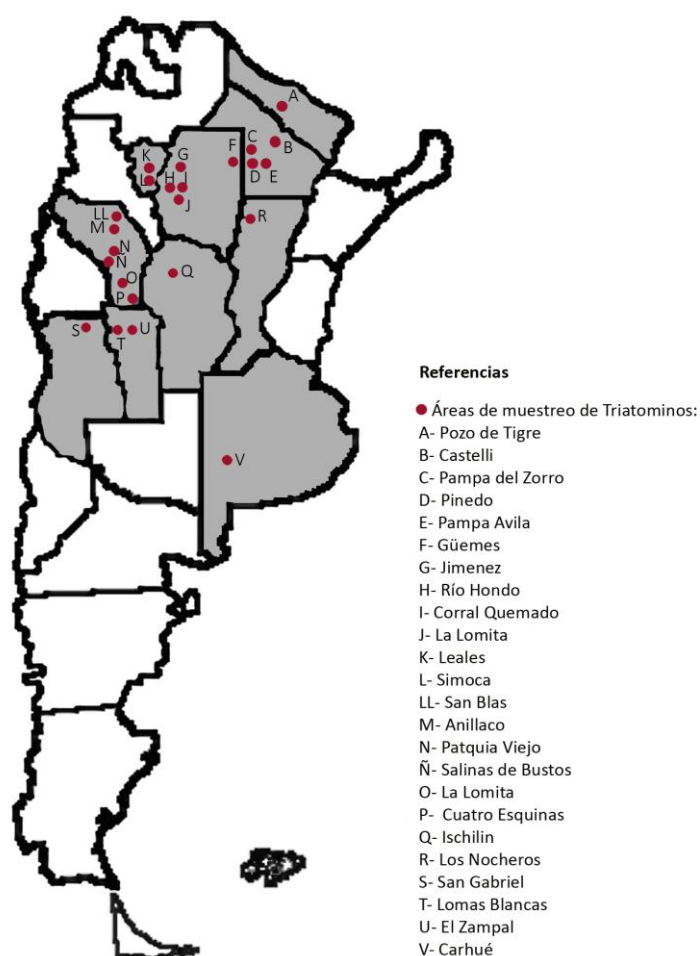


Figura 2m: Mapa de Argentina: en color gris las provincias analizadas.

A continuación se especifican los triatomos estudiados, puntualizando número de ejemplares, especie y provincia. En el caso particular de aquellos recogidos durante el muestreo realizado en el período de beca, se adicionan tablas de coordenadas de los lugares de búsqueda.

### 2.3.1- TRIATOMINOS SILVESTRES

Se recolectaron 125 muestras de un total de 606 insectos de cinco localidades de la provincia de Chaco y dos localidades de la provincia de La

Rioja. En total para ambas provincias se colectaron diez especies (ver anexo tablas. Tablas A, B y C, páginas 74, 75 y 76).

### **2.3.2- TRIATOMINOS EN DOMICILIO Y PERIDOMICILIO**

#### **Triatominos colectados durante este período de trabajo**

Se recolectaron 35 muestras de un total de 590 triatominos pertenecientes a tres especies de las provincias de Chaco, La Rioja, Santa Fe y Santiago del Estero (ver anexo tablas. Tabla D, página 77).

#### **Triatominos colectados previamente**

##### Material conservado en la colección del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE)

Se analizaron 27 muestras de un total de 401 triatominos (399 *T. infestans* y 2 *T. guasayana*), pertenecientes a las provincias de Buenos Aires, Chaco, Formosa, La Rioja, Mendoza, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán (ver anexo tablas. Tabla E, página 78).

##### Material conservado en la colección de otros centros de investigación

Se trabajó con 6 muestras de un total de 120 *T. infestans* pertenecientes a las provincias de Córdoba y Chaco (ver anexo tablas: Tabla F, página 79).

En las siguientes figuras pueden observarse los distintos ambientes estudiados (Figs. 2n; 2o; 2p).



Figura 2n: Captura de triatominos en peridomicilio.



Figura 2o: Captura de triatominos en cardones secos y nidos de aves.



Figura 2p: Captura de triatominos utilizando Trampas Noireau.

Se analizaron un total de 1717 triatominos pertenecientes a 10 especies: *T. infestans*, *T. guasayana*, *T. delpontei*, *T. breyeri*, *T. eraturysiforme*, *T. sordida*, *T. platensis*, *T. garciabesi*, *Panstrongylus guentheri* y *Psammolestes coreodes*. Del total de insectos analizados, 606 (35, 29%), fueron de ambiente silvestre, mientras que 6,23% (107 triatominos) de

domicilio y 58, 47% de peridomicilio (1004 triatominos).

Los resultados positivos por RT-PCR fueron obtenidos de 29 muestras de cuales, 16 fueron de ambiente peridomiciliario y 13 de colectas de insectos silvestres (Tabla G y Fig. 2q).

MUESTRA	PROVINCIA	AMBIENTE	ESPECIE
8	Santa Fe	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
9	La Rioja	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
12	San Luis	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
14	Mendoza	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
15	Tucumán	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
18	Tucumán	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
20	Tucumán	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
22	La Rioja	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
23	La Rioja	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
24	La Rioja	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
26	Santiago del Estero	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
27	Santiago del Estero	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
5	Chaco	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
33	Chaco	Peridomicilio	<i>T. delpontei</i>
34	Chaco	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
31	Chaco	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>
124	Chaco	Silvestre	<i>T. guasayana</i>
7	Chaco	Silvestre	<i>T. delpontei</i>
33	Chaco	Silvestre	<i>T. infestans</i>
9	Chaco	Silvestre	<i>T. infestans</i>
93	Chaco	Silvestre	<i>T. platensis</i>
31	Chaco	Silvestre	<i>P. coreodes</i>
48	Chaco	Silvestre	<i>P. coreodes</i>
49	Chaco	Silvestre	<i>P. coreodes</i>
125	Chaco	Silvestre	<i>P. coreodes</i>
98	La Rioja	Silvestre	<i>T. delpontei</i>
102	La Rioja	Silvestre	<i>T. breyeri</i>
97	La Rioja	Silvestre	<i>T. guasayana</i>
104	La Rioja	Silvestre	<i>T. guasayana</i>

Tabla G: Muestras positivas a TrV mostrando especie, provincia y ambiente donde se halló.



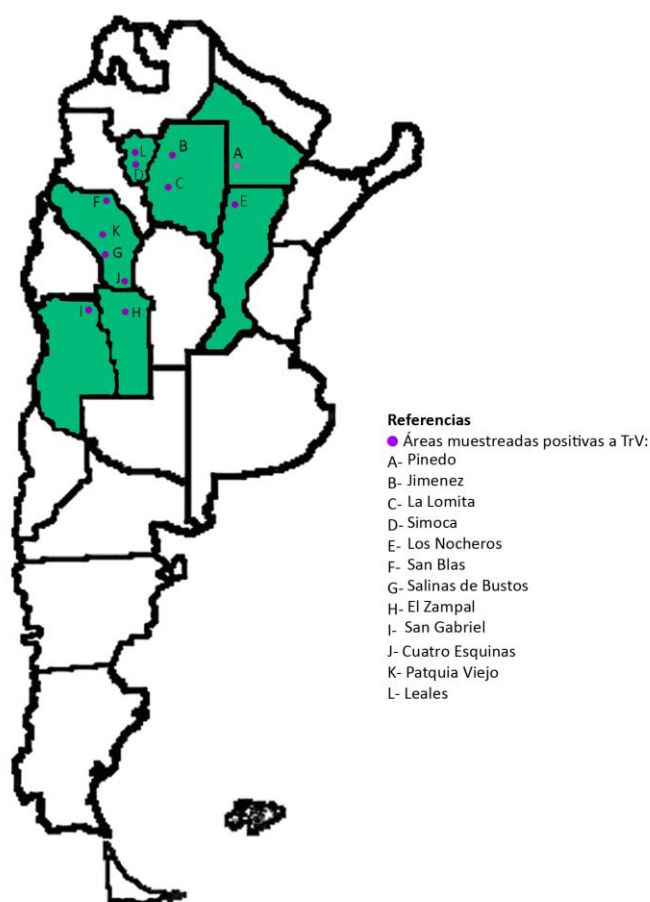


Figura 2q: Mapa de Argentina detallando en color las provincias donde se encontraron muestras positivas a TrV.

De las 29 muestras positivas, 15 fueron secuenciadas, obteniendo secuencias no solo de *T. infestans*, sino también de *T. delponte* y *Ps. coreodes*. Los ambientes donde se ha encontrado TrV fue en gran parte en peridomicilio y el resto en el ambiente silvestre (Tabla H y Fig. 2r). La cepa TIN1 fue secuenciada durante el desarrollo de esta tesis (en la tabla H es la muestra CEPAVE).

MUESTRA	ESPECIE	NOMENCLATURA	PRIMERS		
			VP2/VP4	VP4/VP3	VP1
8(CP)	<i>T. infestans</i>	TIN3	No	No	No
12(CD)	<i>T. infestans</i>	TIN9	No	No	No
14(CP)	<i>T. infestans</i>	TIN5	No	No	No
15(CP)	<i>T. infestans</i>	TIN4	Si	Si	No
18(CP)	<i>T. infestans</i>	TIN10	No	No	No
20(CP)	<i>T. infestans</i>	TIN8	Si	No	No
22(CP)	<i>T. infestans</i>	TIN11	No	No	No
5(CP)	<i>T. infestans</i>	TIN6	Si	Si	No
31(P)	<i>T. infestans</i>	TIN7	No	No	No
7(S)	<i>T. delpontei</i>	TDE1*	No	No	No
33(P)	<i>T. delpontei</i>	TDE2	No	No	No
9(S)	<i>T. infestans</i>	TIN2*	No	No	No
48(S)	<i>Ps. coreodes</i>	PCO1*	No	No	No
26(CP)	<i>T. infestans</i>	TIN12	No	Si	Si
9(CP)	<i>T. infestans</i>	TIN13	Si	Si	No
CEPAVE	<i>T. infestans</i>	TIN1*	Si	Si	No

Tabla H: Muestras secuenciadas mostrando especie, y oligonucleótidos utilizados en cada caso (No/Si hace referencia a si hubo producto positivo para poder secuenciar). La muestra TIN1 corresponde al insectario del CEPAVE (*T. infestans*= Córdoba-Peridomicilio). (Acceso al GenBank: TIN1: HMO44313; PCO1:HM044315; TIN2:HM044314; TDE1:HM044312). Los datos de procedencia y hábitat se detallan en la Tabla G. Muestras (S): silvestre; (D): domicilio; (P): peridomicilio; (C): CEPAVE.



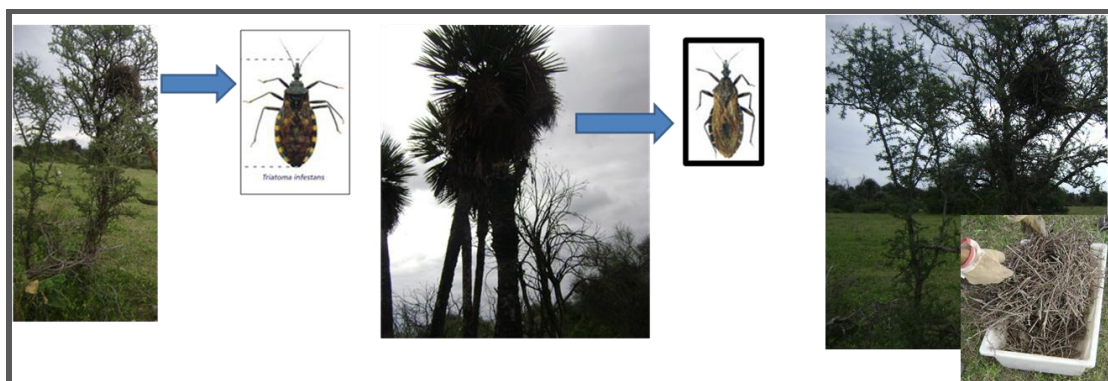


Figura 2r: Especies representativas donde fue hallado TrV. De izquierda a derecha: *Triatoma infestans*, hallada en nido de furnaridos; *Triatoma delpontei* hallada en nidos de *Psitacidos*; *Psamolestes coreodes* encontrada en nido de furnáridos.

### 2.3.3. CONTROL POSITIVO DE TrV

El estudio de las proteínas estructurales presentes en las partículas virales mediante electroforesis en SDS-PAGE dió como resultado la separación en los geles de cuatro bandas correspondientes a 3 proteínas constitutivas del virus; VP2, VP3 y VP1 con peso molecular de acuerdo a la movilidad electroforética de aproximadamente 29, 32 y 30 Kda respectivamente. También aparece una tenue banda (VP0) de peso molecular superior a las tres proteínas principalmente visibles (VP1 – VP3) en el gel (Fig. 2s).

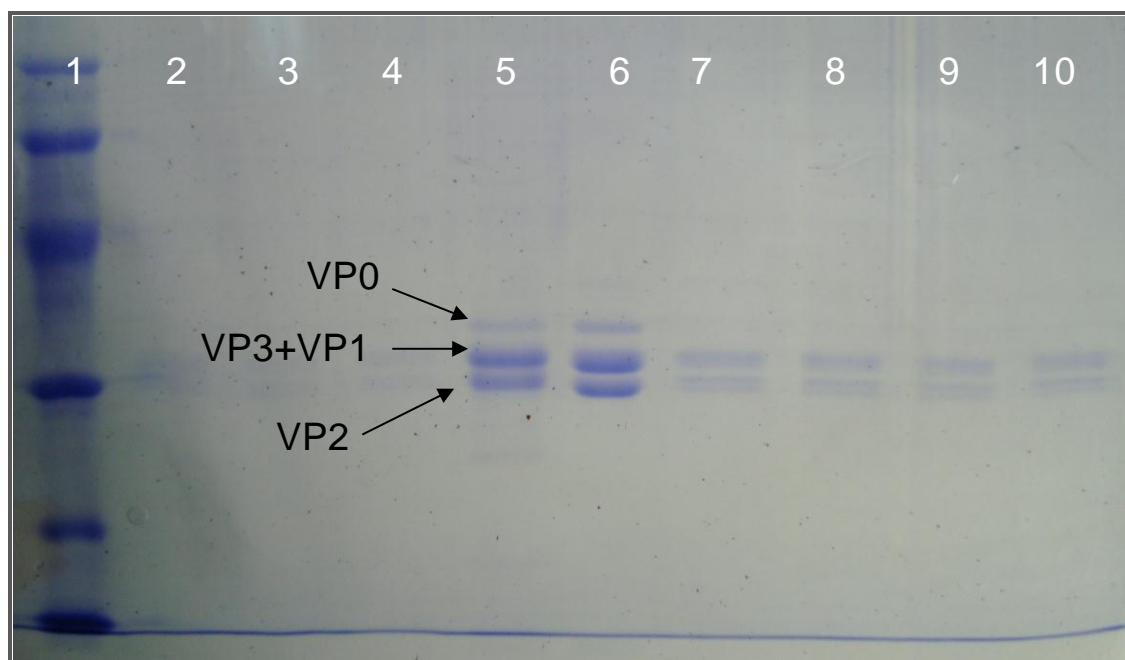


Figura 2s: Técnica de electroforesis en SDS-PAGE para evaluación de partículas virales purificadas. 1: marcador de peso molecular (LMW). 2-10: partículas virales purificadas; se marcan las proteínas de las partículas de TrV purificadas.

#### **2.3.4. DETECCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION**

##### **Técnica de RT-PCR**

Los resultados de la detección por RT-PCR de TrV de los insectos analizados dió positiva en los casos anteriormente mencionados. La visualización del mismo se llevó a cabo en geles de agarosa. En la siguiente figura se muestra en detalle una PCR positiva para el virus (Fig. 2t).

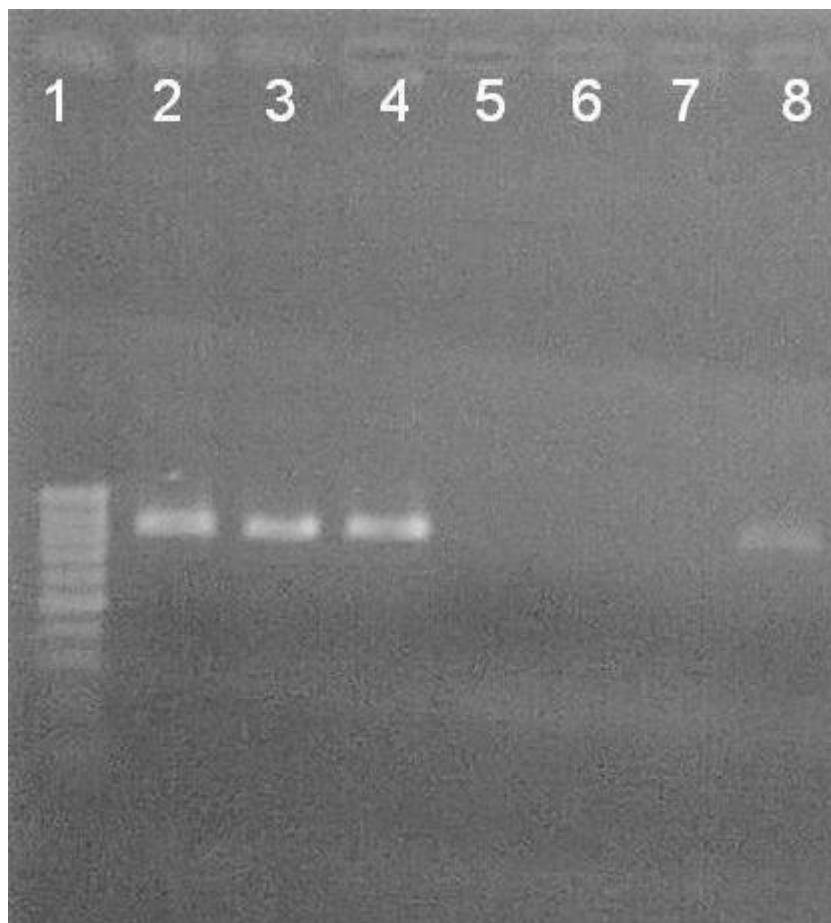


Figura 2t: Gel de agarosa mostrando el resultado de una RT-PCR: 1: marcador de peso molecular; 2, 3 y 4: muestra de materia fecal positiva; 5 y 6: muestras que resultaron negativas al virus; 7: control negativo y 8: TrV como control positivo

### **Purificación y cuantificación**

Los fragmentos amplificados por PCR se purificaron y se cuantificaron en geles de agarosa empleando el MassRuler como patrón de referencia. La purificación de los productos de PCR de cada sector amplificado incognita se comparó en base a la intensidad de la banda del marcador (Fig. 2u).

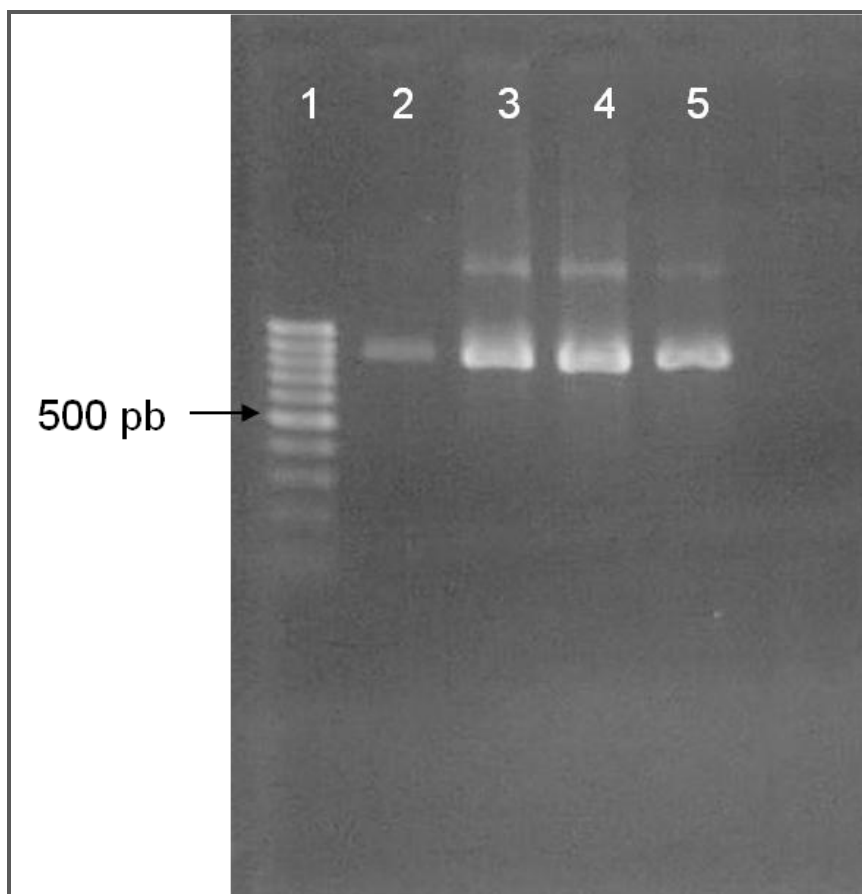


Figura 2u: Purificación y cuantificación en geles de agarosa: 1: marcador de peso molecular. 2-5: patrón de bandas purificadas

### Secuenciación, alineamiento y árboles filogenéticos

Como se mencionó en el apartado anterior, una vez obtenidos los resultados positivos, previa purificación y cuantificación, las muestras se remitieron a secuenciar. Cabe recordar que el genoma de TrV posee dos marcos abiertos de lectura (ORF1 y ORF2). Se describe al ORF1 entre los nucleótidos (nt) 549 a 5936 y al ORF2, entre los nt 6109 a 8715. Tomando como base la única secuencia completa de TrV de la base de datos del GenBank (AF178440) se diseñaron los distintos pares de primers (indicados en el genoma completo). Las distintas subregiones quedan demostradas con los siguientes colores:

VP2 ---VP4---VP3----VP1

Genoma completo de TrV (AF178440):

TTGTGAAAAAGTGGAACAACGACCTGTGGTAAAATGTGAATCTTGTGAAAAGGATACACAAAGACCCA  
CAGTACGTTGTGAAACTTCTACATTAGATATGAAAGTTGATAACCAACCTTGTGATGAATTTCTTACAA  
AATCTCAAGGAGTTTTAGATCTGAATGCATCAGAAGTTTTAGGAAAAATAACGAAGAAGAATCTCTAT  
GCGATGTATATGCCTGGTGTAGGTTGGGACATGCTCTTTTTATTAAAGGGTGTGTTGCAGCCTTTCCCA  
CGCATTTTATAGCTGCAATGAAGTTAAGAATCTCTAAAAATCCTGAAGCTGAAGTTTGTTTTAAATCTCC  
ATTTGTTAATCGTCCTGTTTGGGAAGATGTTAGCTAAAGATCTGATTAATTTAAGCAAACCTTTTCTCTAT  
AAAACAAATTTACCTTGTGATCTTACATTAGCACCTATTAGGGTAGCATGGTCTCATAATGATATTACC  
GACCTATTTGTTTCGGCAAGTGAGGTTAGTAGAGTTATAGAATCTCCTGCTGTGTTACCTCTAATTATGT  
GTGATAATGGAAAGGATCCTGGATTTGGTGTAAATAAAATTCAGTAGTCAGGATCTAGATTACAAGAG  
AAGACTGATTTAATTTATAAGGGACCTGATTCTCAAAATATATACTTAAGATCTGCATGGGAGTATTCA  
CTTGATACTCAATCTGGTGAATTGTGGTGCTCCTTTAATTTAAGAAACCCTATGTGTAGAGGAAAGATCT  
GTGGAATACATGTAGCTGGTCTACCAACTGGTGGACTCGGCTATGCTGTTCCAATTACAAAGGAATTTA  
TTCTTGATTGTTTAAAGTTCCTTTGCAAAACATGATCTGACCACTATATGCAATGTACCTGAAATATCTCA  
ATCTGGAGGAGTTAGTCAACTACCTCTCAATGAACCAATAACTTGGAAATGATAATTTATCTATTCTCGG  
TGAATTTGGTTTAGTTGGGAAGGCAAGAGCTATTCCTTCACCTAGCAAATCTCAAATTAAGTGAATCTCT  
ATCTCATGGAGTAATAGCCCCGGTAAGAACTAGGACTACGCTCCTTTCTCCAATAAAGACTGATTCTGG  
GCCTTGGAATCCTATGCATGAGCGTATGCGAAAGTATGGGAGACCATTGACTGCTTTGGATGAAGAGTT  
AGTTTCTACTTGTGGGGCTGCTCTTCTAAATGACCTTCGCTCTACTTTGGCTCGTCGCAAGATTGATTAT  
ACAAATATTCGGTCTTGTACGATTTTCAGACGGCTATGAGTGGTATTGATGGGGATGAAACTATCAAT  
TCTATAAAACGTAAATCTTCGCCAGGTTTCCCTTGGGTTTTTAAACTTCTAGTGGAAGTGGTAAGAAA  
CAGATTTTTGGAATGATGGTGAATTCCTATTTGATACTCCTTTGGCTGTGGAATTAGAAGAAAAAGTT  
AAGGAGGTGATAGATCTTGCGAAGCAAGGCGTGAGGTATTCTCATGTTTTTGTGATGCATTAAAAGAT  
GAAAGGAAACCGAGAGAGAAAGCTCATAAAACAAGAGCTTTTTCAGGATGTCCTTTGGAGTACCTTGC  
GGTATGTAAGATGATTTTTCAGGGTATCGTCTCGGTATTGACCAAATGCAAAAACGAAACGCATATTAG  
TGTAAGAACTAATGTGTATAGTAAAGATTGGGATTTTATGGCTAGATATCTTAAATCCAAGTCTGATGG  
TTTTGTAGCAGGTGATTTTGAGGGATTTGATTCCCTCAATTGGTGCCTATACTACGAGAAATTGGAAAT  
GTTTTTAATGGTATTGCCAGGCAATTTCCCGATTGGAAGCCAGAAGATGATGAAGTCAGATTAGTTTTA  
CTTCAAAGTTTATGGCATTCTATTACATTAATGGTGGAGATGTTGTAATGTGGGGTCATGCATTGCCTT  
CTGGGCATTATTTGACCGCTCCTTATAACTCTCTTTATGCTACTATGCTTTTCTCAATGGCCTTTGTTATT  
TTGTCTCGCAGGAACGGTACAAGAATGGGCCCTTCTATGCTTGCATCTAAATCTTTAAAGAATTTGGTT  
TTGTGGCATATGGAGATGACCATATTTGTGCCGTTCCGAAACGTTATCAATCCTTTTTCAATCAAATGAC  
TTTGAAAAAGTATTTCTTGAATTAGGAATTGGTTACACAACAGAGGATAAGCGTGAGATTGATGTCCC  
AATTCGTTCTTTAGATGAAATTGCTTATTTAAAAAGAAGTTTCGTTTTAGACGAAGAAAGACAACAATG  
GATCGCTCCTCTGACCCTGGATACTGTATTGGAAACGCCAAGTTGGATTTCATCGTTGTGATGATCCGAT  
AGAAGCAACTGTTTCTAATATAGAATTCGCATTACGTGAGTTGTCTCTCCATTGCAACAAGAGTGGGA  
GAAGTATGCTCCTGTAATGTAAAGTGAAGTAACGAGATTGGGTAGGACTACTATATTTTCATGATTGGGC  
AGATACTAGGGCTTTTGTACTAGATGATCTGTCTCCAGATGAGATATGGAATCCTACGGACTTGACTAT  
GTGATCTTGCTTTTCGTAATAAAATTTCTGTACATAAAAGTCGAAAGTA**TTGCTATAGTTAAGGTTGCGC**  
TTGCCTATTTAGGCATACTTCTCAGGATGGCGCGTTGCAGTCCAACAAGATCCAGGGACTGTACAGAAT  
TTTCCTATACCTCGAGTCGGGTTTGGAAATCT**AAGGTTGACTCGCTGTAAATAATGTAAATATGAAACA**  
**TGAATGTAAATTTCTTCTCAGGATACTACATTTGAACAAAGATCTCAAGAGAAGGTGCAAGCTGGAGAA**  
**ATTAATGAGAGTATTGAGTTTCGAAATCAGATTACTACTTTTGTACATGATAATCCGATAATCACTGAG**

CAACTAATTGGAGATAGTCCACAGCCTTCGGGTGACGTTAGATCGGTTAGTGATGCTCGAACTCATTCT  
ATTATTGATTTCTTAGAAAGACCCAGTTTATTGGATCTTTCTTTGGAACACAAGTGATATTGAAAATA  
AAGAAATCTTTTCCTTGAAATTACCTGATGCACTTATGTCACCTATGATTAGAGAAAAATTATCTGGTTT  
TACATCTTTTAGTGCTAGTACCGTCTTTCATATACAAGTAAATGCTCATCCATTTCAATGTGGAAGATTG  
GTTTTAGCTGCTGTACCTGTTCCAGATATTTTACCTCTACATAGGTTGAACATGTTAAGTTTGTATGTTTC  
TAATGTCATAACTTTACCTCATGTGCAATTGGATATTAGCAAGGAAACAGAAGTCTTATTGAAGATTCC  
TTATGTTTCACCCTTTGTTACAGTATGATCTTGTTACAAAATTTACTCCTTGGGCTGCCTTTTGGCACATGT  
GTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTTAACGTGTTTGCTCATTTTGAAGACATC  
AAACTAGGCTTTCCCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGTGGT  
TTAACAAACACTGTTACGGGTGTTGTTGGAGGAGTTGCAGATGCTGTCAAGGGGTTTTCCCTTCTAT  
TGGAAAGTATGCCGATCCTCTGGTTGGAATTGGCAATGGTTTGACTGGGTATTGTGAGCTTTAGGTTT  
TCCAAACCTTTAACTACAATCCCGCCAACTATTGTTGTTCAACGACCCTCTCAATATTTAATAATGCTG  
ATGGTGTAGATCAAGGACTTCCTTTGAGTCTTAAATATGGAAATGAGGTTATTTGAAAACACCTTTTG  
CCGGAACATCTTCTGATGAGGTGGCGCTGGAGTATGTTTTAAAAATACCTAATTACTTTTCTAGATTAA  
ATACTCGAGTACGTCCTTACCTAAGCAAGTATTGTGGACTTCTCCTGTTTCATCCTCAAATAATACGTAAT  
CACGTTACAGTTGTGATGCTCCAGGGCAGCCTACTTTGCTAGCTTATGCCACAGGATTTTCAAATATI  
GGAGAGGTGGTCTCGTTTATACGTTTAGATTGTTCAAAACTAATCATCTCTGGTAAGAGTCCAAATTA  
CATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGATTCCGATGGTAAGATAGTTAGAGATGAATACG  
TCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTAC  
TCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTAAATACAACCTATGAACCTAGAGA  
CTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTCTTTACAGGAACACTTTGTGTTTCTGCTTTAACTCCT  
CTGGTITAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCGACTATAGATGTTTTAGTTGAGGTTAAAGCCTCAGATGATT  
TGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGAT  
GGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGG  
GGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTGATGAACAGCCTTCTCAAG  
AATGTATGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATCTTGCGGATACGTTTCTGA  
CGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACA GCTGCTGACA  
AACTACCTGTTTGAGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTA  
CGCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAAGATTGTTCCCGGTGTTGCCGATCAACCTAAACCTCTGGT  
AGAAGTGGCTTTGTTTACTATGCAGGATCAAGGCTATATCATTAAGCTAATGATTATAGCACTGATT  
CTGCTCGTCCAATATATATGAAAATTTGTTACTAAAGGAATAGCAGAGGTACAAACTCCTTATTATTCT  
AAGGGTTAATACCTCTGTTGTTTCTGCTCCTGTTCTTTATAACGCAGGTAATATTTCTCCACTAATGCCG  
AATGTTATGTATAAGATAACATCAAATTCATCAAACATTCTGCTTGGTCATTCTGCTGCTGATGATTCC  
GTTTTGGATTTCTCTTGGGAGCTCCATTAGCTATTTAGCTACGGCTCTTAGAGATAACTTTACGGGATC  
CTCTGCTACAGTTTCTCTTCCCTACCTTCTCAAATTTTATCTATCTTCGACTTCAGAGTCCACTACTTAGA  
GGCTAGTGGTTGTTTCGTACATTGGGTCAAGACTCAGTCTTGTTTTCCGTATGTAAATATAAATATACAT  
TCATTTATTGTAAATAATTATATATATAATTTGTTTGTGTTGTAATAATGTGCTTTTATATGTTTGTG  
TCTGTGTCTTTCAGGTTTCTTCTTGATTCTTCCTGAGGGTACTAATCGAATCATGTATTTGTTTTATTAT  
TATATACGTTTTTGTTCGCTTTGTCCGTTACAGTGACCAAGTTTTGGCAATAGCTGACACTTGTTTTAC  
AGCTTCTTTCTGC

Así se realizó la traducción del ORF2. El orden de las proteínas se indica a continuación con los colores correspondientes:

VP2 --VP4---VP3---VP1

LAVNNVNMKQMNVNSSQDTTFEQRSQEKVQAGEINESIEFRNQITTFVHDNPIITEQLIGDSPQPSGDVRSVS  
 DARTHSIIDFLERPQFIGSFLWNTSDIENKEIFSLKLPDALMSPMIREKLSGFTSFSASTVFHIQVNAHPFQCGR  
 LVLAAPVVPDILPLHRLNMLSFDVSNVITLPHVQLDISKETEVLLKIPYVSPFVQYDLVTKFTPWAAFLAHVY  
 APLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFTSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGVVGGVADAVKGFFPSIGKYA  
 DPLVGIGNLTGLLSALGF SKPLTTIPPTIVVQRPSQYFNNADGVDQGLPLSLKYGNEVILKTPFAGTSSDEVA  
 LEYVLKIPNYFSRFKYSSTSLPKQVLWTSPVHPQIIRNHVTVVDAPGQPTLLAYATGFFKYWRGGLVYTFRF  
 VKTNYHSGRVQITFHPFVGYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVNS  
 ANRPKYNIEPRDFKVYDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLVPV  
 DSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNW  
 RYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRLKIVPGVADQPKP  
 LVEVALFTMQDQGYIHKANDYSTDFCSSNIYENFVTKGIAEVQTPYYSRVNTSVVSAPVLYNAGNISPLMPN  
 VMYKITSNSSNILLGHSAAADDFRFGFLGAPLAISATALRDNFTGSSATVSLPTFSNFYLSSTSESTI

Para la amplificación del ORF2 se tomaron regiones previas y posteriores al mismo, esto significa la región intergénica y la región 3', respectivamente, en forma solapada. Para subregión VP2 --VP4; el par de primers está indicado en negrita y subrayado. El tamaño esperado del mismo es de 975 pb.

<b><u>TTGCTATAGTTAAGGTTGCG</u></b>	53.6°C	y	RC	GACAGCATCTGCAACTCC
55.0°C				
				<b><u>GGAGTTGCAGATGCTGTC</u></b>

Para subregión VP4 ---VP3; el par de primers está indicado en *italica* y subrayado. Siendo el tamaño esperado de 1031 pb.

<i><u>AAATTACTCCTTGGGCTG</u></i>	54.5°C	y	RC	ACTACGGCAGAACTACTAACC
53.0°C				
				<i><u>GGTTAGTAGTTCTGCCGTAGT</u></i>

En el caso de la subregión **VP1**; el par de primes está indicado en rojo y subrayado, siendo el tamaño esperado del amplicon de 864 pb.

<b><u>ATCCTGCCGCTATGTATACT</u></b>	54.1°C y RC	<b><u>ACAAGTGTCTAGCTATTGCC</u></b>
53.7°C		
		<b><u>GGCAATAGCTGACACTTGT</u></b>

En la secuencia completa (ver genoma completo; arriba) en caja, se indican los primers TrV1a y TrV1b utilizados para la PCR diagnóstica, en la subregión **---VP3---VP1---**. Para este par de primers el tamaño esperado es de 832 pb.

Las secuencias obtenidas de ambas cadenas de cada producto de PCR por región amplificada se describen en el anexo secuencias, al final del capítulo. Se ha podido amplificar parte de la VP4 en la PCR con los primers VP4/VP3 y VP2/VP4. A la vez, la región TrV1a y TrV1b solapa con la región diseñada para amplificar VP3/VP1.

En el apartado se detallan las secuencias obtenidas, por región. Primero nucleótidos, luego aminoácidos, con sus respectivos alineamientos e hipótesis filogenéticas propuestas en cada caso (Ver anexo Secuencias).

En base a las secuencias obtenidas, estas se alinearon con el programa MEGA usando el algoritmo ClustalW (CLUSTAL 2.1). Se compararon con la cepa de referencia (AF178440) y con la cepa TIN1 (HM044313) de nuestro laboratorio.

En el anexo se grafican todas las secuencias obtenidas para la región comprendida por los primers TrV1a y TrV1b de nucleótidos; alineamiento y árbol. Para la realización de la reconstrucción filogenética de nucleótidos, fueron utilizados 15 taxones. El método elegido fue el de Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 replicas. El modelo utilizado fue el de Maximum Composite Likelihood. El porcentaje de identidad de secuencias varió entre 99,3 y 100% (10 cambios de nucleótidos). Se utilizó el mismo procedimiento para los aminoácidos. Para la realización de la reconstrucción filogenética de aminoácidos, fueron utilizados 15 taxones con el método de Neighbor-Joining y un Bootstrap de 1000 replicas. El modelo utilizado fue el de Poisson



correction. El porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos vario entre 98,9 y 100% (4 cambios aminoacídicos).

Luego para la subregión VP2/VP4 (nucleotidos); y para la misma subregión en el caso de los aminoácidos. El diseño de estos primers permitió amplificar una zona intergénica previa al ORF2. Debido a la presencia de un codón de stop (TAG) la traducción comienza en el codón CTC. El porcentaje de identidad de secuencias nucleotídicas varió entre 99,5 y 100% (6 cambios de nucleótidos). El porcentaje de identidad de secuencias aminoacídicas varió entre 99,6 y 100% (un solo cambio aminoacídico).

Para el caso de la región VP4/VP3; el porcentaje de identidad de secuencias nucleotídicas varió entre 99,3 y 100% (8 cambios nucleotidicos) y el porcentaje de identidad de secuencias aminoacídicas varió entre 99,1 y 100% (3 cambios de aminoácidos).

En cuanto a la región VP1: el diseño de estos primers permitió amplificar la región VP1 y una zona no traducida cercana al 3' final del ORF2. Debido a la presencia de un codón de stop (TAG) la traducción finaliza. El porcentaje de identidad de secuencias nucleotídicas varió entre 99,8 y 100% (2 cambios de nucleotidos) que involucran la región no traducida 3'. El porcentaje de identidad de secuencias aminoacídicas es del 100%.

Para las ultimas tres regiones, nos pareció redundante la realización de árboles filogenéticos, es por ello que no vimos necesaria la inclusión de los mismos en este apartado.

#### **2.3.5. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION (MET)**

Al microscopio electrónico se observaron numerosas partículas virales en todas las muestras positivas para PCR de la materia fecal de los triatominos analizados. Esto se realizó para la confirmación de los insectos positivos a TrV, como así también para muestras negativas (algunas); elegidas en forma azarosa y realizando pooles de las mismas (Fig. 2v).

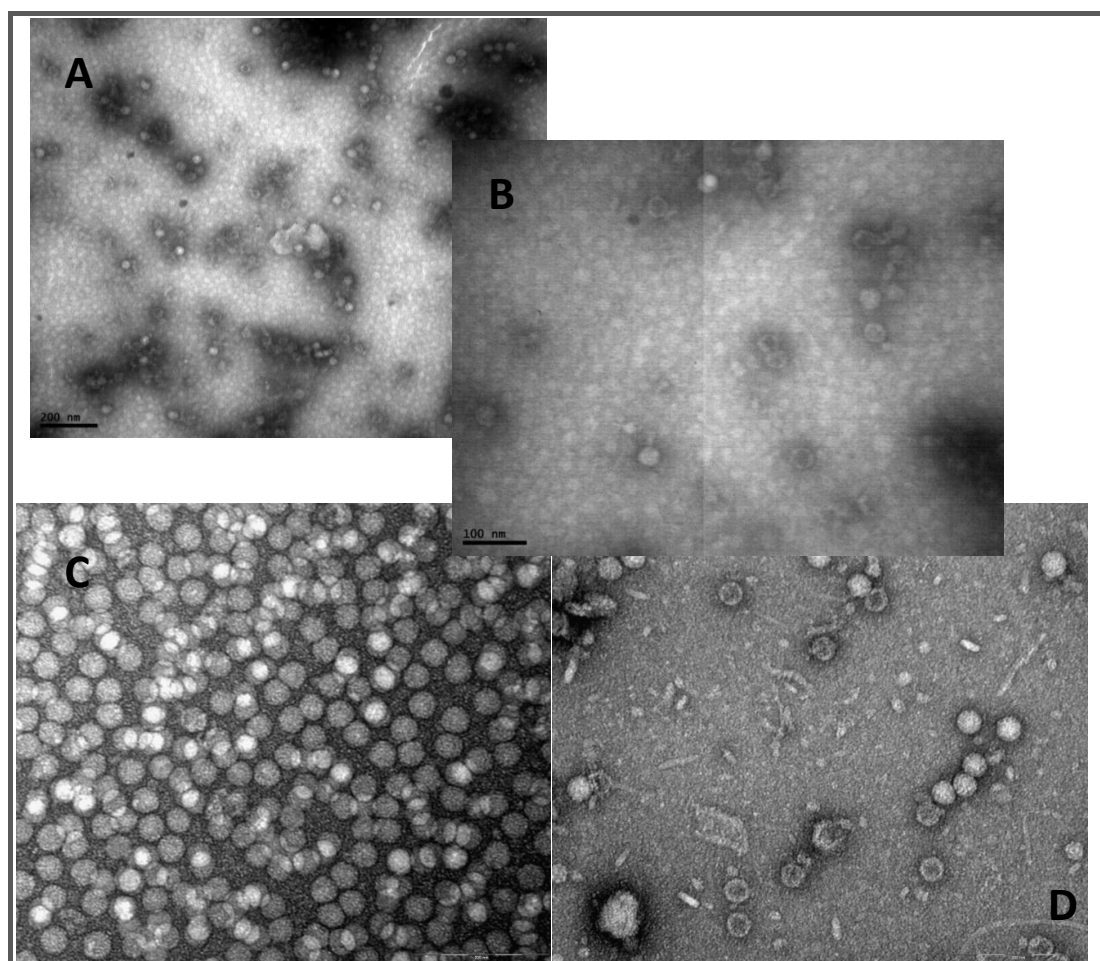


Figura 2v: Técnica de tinción negativa. Observación de partículas virales de TrV a distintos aumentos. A: 80K. B, C y D: 250K.

## 2.4. DISCUSION

Tal como se mencionó en el Capítulo I, TrV es el único virus identificado en triatominos hasta el momento. Resultados anteriores han mostrado la presencia de TrV en *T. infestans* sólo en domicilio y peridomicilio y *T. sordida* en un domicilio de la provincia de Chaco, especie que invade las viviendas pero que habita principalmente el ambiente silvestre y peridomiciliario (Muscio, 1988, Marti et al., 2009).

En los domicilios no se han podido encontrar resultados positivos debido a que el número de muestras fueron escasas mientras que en 7 de las 10 provincias analizadas se encontró la presencia de TrV en el peridomicilio. Si

se incrementara el número de muestras en los domicilios seguramente se obtendrían resultados similares a los encontrados por Marti et al., 2009.

Sin embargo, en este trabajo no solo se encontró a TrV asociado a los peridomicilios sino que se lo halló en el ambiente silvestre en diversas especies como *T. breyeri*, *T. infestans*, *T. guasayana*, *T. delpontei*, *T. platensis* y *Ps. coreodes*.

A excepción de *T. infestans*, las especies anteriormente mencionadas son encontradas habitualmente en el ambiente silvestre, pero el hallazgo de *T. infestans* en nidos de aves es sumamente relevante. En Sudamérica son escasos los hallazgos de *T. infestans* en el ambiente silvestre, limitándose al Chaco Boliviano, en huecos de arboles y nidos de loros (Noireau et al., 1997; 1999; 2000 y Waleckx et al., 2012); en Chile, relacionados a pilas de rocas (Bacigalupo et al., 2006); en Paraguay, en ramas secas y huecos de árboles (Yeo et al., 2005 y Rolón et al., 2011) y en Argentina, asociados a *Amazona aestiva* (Psittaciidae) (Ceballos et al., 2009). En nuestro país, los primeros reportes de la presencia de *T. infestans* en nidos de aves fueron mencionados por Massa en la década del '30 y posteriormente, en 1980 Carpintero, encuentra a *T. infestans* en nidos de furnáridos y en otras especies de aves (Turienzo y Di Iorio, 2007). Aunque el objetivo de este trabajo no fue el estudio ecológico de los triatominos, consideramos relevante la importancia de este hallazgo, ya que ante la eliminación de *T. infestans* de domicilios y peridomicilios, los focos silvestres podrían ser los que colonicen nuevamente éstos hábitat.

La presencia de TrV en 5 especies silvestres en Chaco (*T. infestans*, *T. guasayana*, *T. delpontei*, *T. platensis* y *Ps. coreodes*) y de 3 especies en La Rioja (*T. breyeri*, *T. guasayana* y *T. delpontei*) nos indican que seguramente realizando una búsqueda más metódica en otras provincias Argentinas podría aumentar aún más las evidencias que el virus está circulando en la naturaleza.

La presencia de TrV en especies silvestres y de peridomicilios así como la presencia de *T. infestans* y *T. delpontei* co-habitando el mismo sitio en la zona de El Palmar en la provincia de Chaco, nos podría indicar que el virus se encuentra en todos los ambientes (domiclio, peridomicilio y silvestre). La naturaleza refractaria de las aves a *T. cruzi* es citada numerosas veces (Texeira

et al., 2006) y las aves también son consideradas refractarias a TrV como ocurre con el parásito, o pueden desarrollar anticuerpos como respuesta, si fueron infectados con TrV. Aunque esto no fue estudiado hasta ahora, las aves podrían ser consideradas como reservorios de TrV, asumiendo que los triatominos se alimentan de estos. Sin embargo la experiencia en el laboratorio muestra que al menos las gallinas no manifiestan signos clínicos; estas sirven de alimento al insectario y han desarrollado anticuerpos específicos a TrV (Marti, comunicación personal).

Hasta el momento 9 especies de triatominos han sido reportadas como susceptibles a TrV tanto en laboratorio como en insectos de campo (Muscio 1988; Rozas Dennis et al., 2002; Marti et al., 2009). La presencia de TrV en materia fecal de *T. breyeri* y *Ps. coreodes* como nuevos hospedadores, incrementa a 11 el número de especies susceptibles al virus.

Muscio y colaboradores reportan a TrV en *T. infestans* en peridomicilios del paraje Media Naranja de la Provincia de Córdoba (Muscio et al., 1988) y posteriormente, se lo encuentra en domicilios y peridomicilios de 8 provincias de Argentina (Marti et al., 2009). Los resultados obtenidos en la presente investigación contribuyeron a ampliar la distribución del virus en varias especies del ambiente silvestre, incrementándose de esta manera la posibilidad de un potencial uso como agente de control biológico contra los vectores de la enfermedad de Chagas. Hasta el presente los programas para el control de la Tripanosomiasis Americana se basan exclusivamente en el uso de químicos dentro de las viviendas y alrededor de ellas y no se ha llevado a cabo ninguna prueba con TrV en el ambiente silvestre con agentes biológicos conocidos.

El esclarecimiento de la diversidad y el número, hospederos y efectos patogénicos quizás revelen los roles principales de Dicistrovirus en la biosfera (Bonning y Miller, 2010). La prevalencia de TrV en Argentina ya ha sido parcialmente estudiada, sin embargo en triatominos de otras áreas endémicas para la enfermedad en el resto de Latinoamérica, es aún desconocido. Las colonias de triatominos que viven en insectarios de países de América Latina reciben periódicamente nuevos insectos del campo, los cuales pueden estar infectados con TrV. Teniendo en cuenta esta posibilidad, los insectarios podrían ser fuente del virus. Esta es una de las razones por la cual la

presencia de TrV en los insectarios de América Latina deberían ser estudiados y evaluados, ya que colonias libres de TrV estarían bajo un alto riesgo de infección y de este modo podrían destruir insectarios.

Las proteínas de la cápside viral han demostrado ser el objetivo para estudios filogenéticos en otros Dicistrovirus (Hunter et al., 2006; Tapaszti et al., 2009). De Miranda mostró que el aislamiento del Kashmir bee virus y el virus de la parálisis de la abeja, pueden ser en términos generales separados por su origen geográfico, pero es más difícil identificar tendencias regionales dentro de cada lugar geográfico (continente) (De Miranda et al., 2004). En el caso del Black Queen Cell Virus (BQCV), Tapaszti, describe que el ORF1, cerca de su extremo 5' a nivel de la helicasa (583 pares de bases), es mucho más variable que otras regiones incluso del mismo ORF1 y respecto al ORF2 y que en general, el agrupamiento filogenético logrado en su trabajo corresponde a un origen geográfico de los genotipos, como es el caso del Acute Bee Paralysis Virus (ABPV) (Tapaszti et al., 2009). En otros casos esto no ocurre. Sin embargo, estos autores, realizan una filogenia basada en las proteínas estructurales del ORF2 (514 pares de bases) que brindó mayor resolución que utilizando el ORF1, y permitió separar cepas de Polonia, Austria y Hungría. Esto no podemos analizarlo ya que aún no se ha descrito a TrV en otros países que no sea Argentina. Otros autores, sin embargo, obtuvieron dos linajes distintos analizando la región IG y parte del ORF2 en Israeli Acute Paralysis Virus –IAPV- (Blanchard et al., 2008).

Con respecto al análisis de las secuencias descriptas en nuestro caso, las mutaciones encontradas a nivel nucleotídico resultaron en cambios de aminoácidos en distintas posiciones: esto quedó evidenciado en todas las regiones analizadas. En la región comprendida por los primers TrV1a y TrV1b, los cambios fueron 10 nucleótidos correspondientes a 4 cambios aminoacídicos. En la subregión VP2/VP4 fueron 6 los cambios de nucleótidos dando lugar a un solo cambio aminoacídico. La región VP4/VP3 tuvo 8 cambios nucleotídicos correspondientes a 3 de aminoácidos. En cuanto a la región VP1 fueron 2 los cambios de nucleótidos que no involucraron cambios aminoacídico, (mutación silenciosa).

Nos hemos encontrado con la dificultad en cuanto al bajo porcentaje de recuperación de ARN en las muestras de materia fecal de los triatominos

analizados. Esto lo atribuimos principalmente al hecho de que, a pesar de cuidar al extremo los materiales para trabajar y disminuir al mínimo el riesgo de contaminación que hace que el ARN se inactive, las muestras conservadas en agua libre de nucleasas a -20°C no se podían recuperar en su totalidad. Eso llevó a que cada vez que debíamos probar un nuevo juego de primers para amplificar determinada secuencia, tuviéramos que partir de muestras de materia fecal y no de ARN ya extraído con anterioridad. Las muestras de materia fecal, si bien son sumamente provechosas, también son limitadas para los subsiguientes usos.

Aunque el número de secuencias genómicas analizadas en Argentina es bajo y sólo se ha hallado hasta el momento la presencia de una muestra positiva a TrV de *T. infestans*, en Bolivia, nos permite abrir las puertas para futuras investigaciones. Una muestra diagnosticada por AC-ELISA durante el 2005 en la localidad de Tarija, Bolivia (Marti, comunicación personal) nos lleva a realizar futuras investigaciones en triatominos de Bolivia y Paraguay. Complementando a estos estudios en este momento también se están realizando estudios serológicos en sueros humanos obtenidos de localidades donde se ha encontrado la presencia de TrV en Argentina y en algunas localidades del sur de Bolivia. Paralelamente a estos estudios también se está realizando un relevamiento en insectarios de Latinoamérica para poder afirmar de esta manera en que especies de triatominos encontramos a TrV y si solo se encuentra en Argentina.

Tabla A: Muestras del ambiente silvestre (Provincia de Chaco) mostrando localidad y tipo de colecta; especie y número de insectos por muestra (N).

MUESTRA	LOCALIDAD	COLECTA		ESPECIE	N
3.5.6.124	El Palmar (1)	Manual	Cardón seco	<i>T. guasayana</i>	24
4	El Palmar (1)	Manual	Palmera	<i>T. guasayana</i>	3
7.15.25.26.32.33.35	El Palmar (1)	Manual	nido-cotorra	<i>T. delpontei</i>	174
36.37.47.50.79.89				<i>T. infestans</i>	4
9.10.11.13.14	El Palmar (1)	Manual	nido-furnarido	<i>T. infestans</i>	5
31.34.38.39.40.41				<i>T. platensis</i>	20
42.43.44.45.48.49				<i>T. guasayana</i>	4
77.78.88.93.106				<i>Ps. coreodes</i>	102
107.108.109				<i>P. guentheri</i>	1
18.19.20.21.22.53.73	El Palmar (1)	Pasiva	Trampa de luz	<i>T. infestans</i>	15
74.75.76.80.81.82.83				<i>P. guentheri</i>	4
84.86.112.113				<i>T. guasayana</i>	2
1	El Palmar (2)	Manual	Palmera	<i>T. infestans</i>	1
8.12	El Palmar (2)	Manual	volando - al humano	<i>T. guasayana</i>	2
16.17.23.24.29	El Palmar (2)	Pasiva	Trampa de luz	<i>T. infestans</i>	33
30.46.51.52.87.90.91.92				<i>T. guasayana</i>	1
94.95.96.110.111				<i>P. guentheri</i>	9
2	Tres Estacas	Manual	Corteza	<i>T. sordida</i>	1
27.28	Las Breñas	Manual	Nido-furnarido	<i>Ps. coreodes</i>	18
				<i>T. platensis</i>	4
125	El Picazo	Manual	Nido-furnarido	<i>Ps. coreodes</i>	4

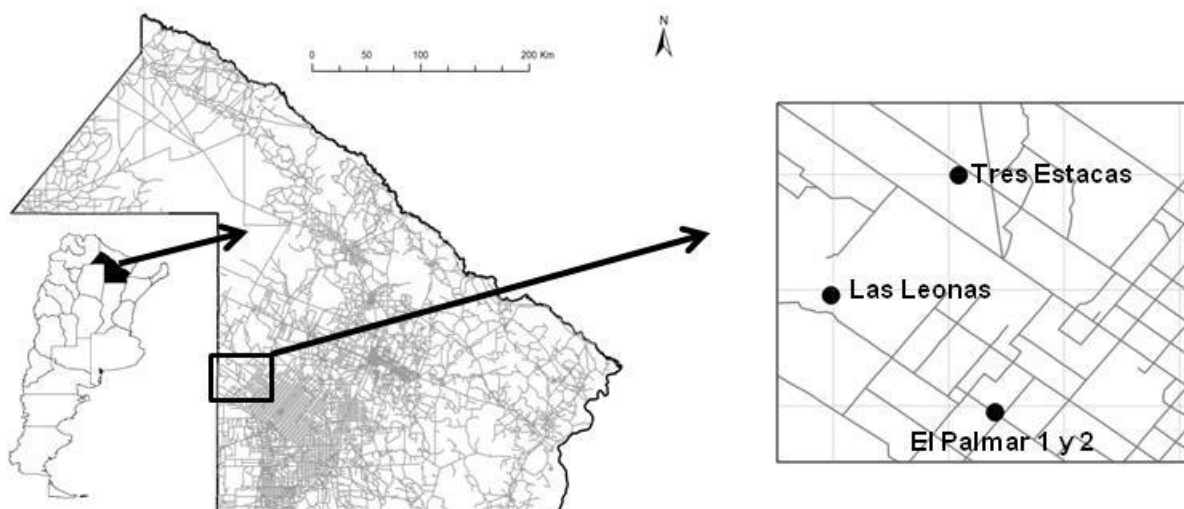
Tabla B: Muestras del ambiente silvestre (Provincia de La Rioja) mostrando localidad y tipo de colecta; especie y número de insectos por muestra (N).

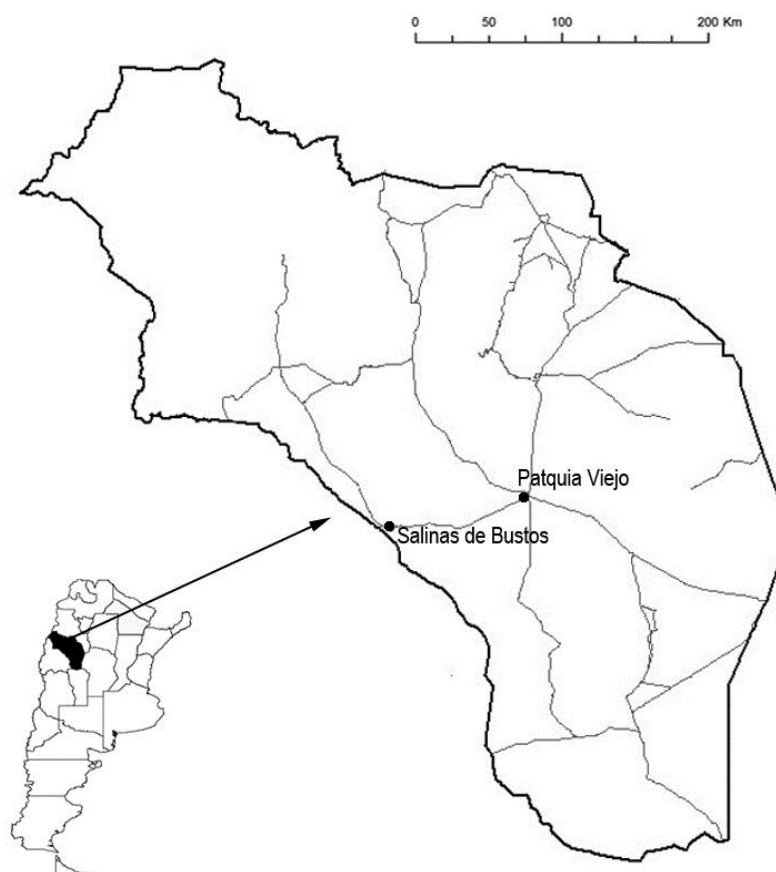
MUESTRA	LOCALIDAD	COLECTA		ESPECIE	N
61	Patquia Viejo	Manual	Nido-furnarido	<i>T. garciabesi</i>	10
98	Patquia Viejo	Manual	Nido -cotorra	<i>T. delpontei</i>	1
54.57.59.60.85	Patquia Viejo	Pasiva	Trampa de luz	<i>T. breyeri</i>	5
102.114.115.116				<i>T. garciabesi</i>	15
117.119.121.123				<i>T. guasayana</i>	6
				<i>T. platensis</i>	2
				<i>T. infestans</i>	6
55.56.58.99.100	Patquia Viejo	Pasiva	Trampa Noireau	<i>T. breyeri</i>	84
101.118.120.122				<i>T. infestans</i>	6
64.65.66.	Salinas de Bustos	Manual	nido-furnarido	<i>T. platensis</i>	2
				<i>Ps. coreodes</i>	1
97	Salinas de Bustos	Manual	volando al humano	<i>T. guasayana</i>	19
				<i>T. eraturysiforme</i>	2
62.63.67.68.70	Salinas de Bustos	Pasiva	Trampa de luz	<i>T. eraturysiforme</i>	6
71.72.103.104.105				<i>T. garciabesi</i>	1
				<i>T. guasayana</i>	7
				<i>T. platensis</i>	1
69	Salinas de Bustos	Pasiva	Trampa Noireau	<i>T. breyeri</i>	1



Tabla C: Tabla coordenadas de las áreas silvestres (Provincias de Chaco y La Rioja) donde se realizaron las colectas y total de especies silvestres. En el mapa se detallan los lugares de muestreo en Chaco y La Rioja.

LOCALIDADES	COORDENADAS
El Plamar 1	S 27° 04.792'
	O 61° 32.125'
El Palmar 2	S 27° 08' 14"
	O 61° 34' 26,1"
Las Breñas	S 26° 48' 58,4"
	O 61° 34' 14,7"
Tres Estacas	S 26° 55' 36,5"
	O 61° 38' 10,7"
Salinas de Bustos	S 30° 12' 522"
	O 67° 35' 367"
Patquia Viejo	S 30° 10' 243"
	O 66° 57' 251"





Total de especies silvestres.

ESPECIES	TOTALES
<i>Panstrongilus guentheri</i>	14
<i>Psammolestes coreodes</i>	125
<i>Triatoma breyeri</i>	90
<i>Triatoma delpontei</i>	175
<i>Triatoma eratyrusiforme</i>	8
<i>Triatoma garciabesi</i>	26
<i>Triatoma guasayana</i>	68
<i>Triatoma infestans</i>	70
<i>Triatoma platensis</i>	29
<i>Triatoma sordida</i>	1

Tabla D: Muestras de triatomíneos en domicilio y peridomicilio mostrando provincia y localidad; tipo de colecta, especie y número de insectos por muestra (N). Además se detalla el total de especies.

MUESTRA	PROVINCIA	LOCALIDAD	COLECTA	ESPECIE	N
1.3.4.5.6.11.12.13	Chaco	Pinedo	Peridomicilio	<i>P. guentheri</i>	1
14.15.16.18.20.21.23				<i>T. infestans</i>	365
27.28.29.33.34				<i>T. guasayanas</i>	8
17.19.22	Chaco	Pinedo	Domicilio	<i>P. guentheri</i>	2
				<i>T. infestans</i>	1
7.8	La Rioja	Salinas de Bustos	Domicilio	<i>T. infestans</i>	2
9.10.24.25	La Rioja	Salinas de Bustos	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	61
				<i>T. guasayana</i>	1
26	Chaco	Patquia Viejo	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	30
30	Santa Fe	Los Nocheros	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	35
2	Santiago del Estero	Sachayoj	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	4
31,32	Chaco	Tres Estacas	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	60
35	Santiago del Estero	Corral Quemado	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20

Total de especies de domicilio y peridomicilio.

ESPECIES	Nº
<i>Triatoma infestans</i>	578
<i>Triatoma guasayana</i>	9
<i>Panstrongilus guentheri</i>	3
Total	590

Tabla E: Muestras del Material conservado en la colección del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) mostrando provincia y localidad; tipo de colecta, especie y número de insectos por muestra (N).

MUESTRA	PROVINCIA	LOCALIDAD	COLECTA	ESPECIE	N
1	Buenos Aires	Carhué	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	4
2	Chaco	Pampa del zorro	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	25
3	La Rioja	Anillaco	Domicilio	<i>T. guasayana</i>	1
4	La Rioja	Anillaco	Domicilio	<i>T. guasayana</i>	1
5	Chaco	Pampa Avila	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	15
6	Formosa	Pozo del Tigre	Domicilio	<i>T. infestans</i>	40
7	Tucumán	Leales	Domicilio	<i>T. infestans</i>	20
8	Santa Fe	Los Nocheros	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20
9	La Rioja	San Blas	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	10
10	Chaco	El Palmar	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20
11	Chaco	El Palmar	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20
12	San Luis	Lomas Blancas	Domicilio	<i>T. infestans</i>	10
13	San Luis	El Zampal	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20
14	Mendoza	San Gabriel	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20
15	Tucumán	Simoca	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20
16	Tucumán	Leales	Domicilio	<i>T. infestans</i>	20
17	Tucumán	Simoca	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20
18	Tucumán	Leales	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	10
19	Tucumán	Leales	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	10
20	Tucumán	Leales	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	10
21	Santiago del Estero	Río Hondo	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	10
22	La Rioja	Cuatro Esquinas	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20
23	La Rioja	La Lomita	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	10
24	La Rioja	Anillaco	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20
25	La Rioja	Anillaco	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	5
26	Santiago del Estero	Jimenez	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	10
27	Santiago del Estero	La Lomita	Domicilio	<i>T. infestans</i>	10

Tabla F: Muestras del Material conservado en la colección de otros centros de investigación mostrando provincia y localidad; tipo de colecta, especie y número de insectos por muestra (N).

MUESTRA	PROVINCIA	LOCALIDAD	COLECTA	ESPECIE	N
1	Córdoba	Dpto. Ischilin Loe Chuña	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20
2	Córdoba	Dpto. Ischilin Loe Chuña	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20
3	Chaco	Dpto. Guemes, Loc. Castelli	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20
4	Chaco	Dpto. Guemes, Loc. Castelli	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20
5	Chaco	Dpto. Guemes, Loc. Castelli	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20
6	Chaco	Dpto. Guemes, Loc. Castelli	Peridomicilio	<i>T. infestans</i>	20

**Región TrV1a y TrV1b****Nucleótidos:**

&gt;AF178440

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
 TTCGGATGGTAAGATAGTTAGAGATGAATACGTCCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
 ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATTCAGCAAATCGTC  
 CTAAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
 TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCGACTATAGATGTTTTAGTTGAG  
 GTTAAAGCCTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
 AGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
 TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTGATGAACAG  
 CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATCTTGGCGATACG  
 TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
 CAACTACCTGTTTGAGACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
 GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

&gt;PCO1

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
 TTCGGATGGTAAGATAGTTAGAGATGAATACGTCCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
 ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATTCAGCAAATCGTC  
 CTAAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
 TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCGACTATAGATGTTTTAGTTGAG  
 GTTAAAGCCTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
 AGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
 TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTGATGAACAG  
 CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATCTTGGCGATACG  
 TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
 CAACTACCTGTTTGAGACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
 GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

&gt;TDE1

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
 TTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
 ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATTCAGCAAATCGTC  
 CTGAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
 TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAGTTGAG  
 GTTAAAGCCTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
 AGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
 TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTGATGAACAG  
 CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATCTTGGCGATACG  
 TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
 CAACTACCTGTTTGAGACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
 GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

&gt;TDE2

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
 TTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
 ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATTCAGCAAATCGTC  
 CTGAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
 TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAGTTGAG  
 GTTAAAGCCTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
 AGAGGCCTTCGTTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGCACCTCGTGATATCCGTTT  
 TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTGATGAACAG  
 CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATCTTGGCGATACG  
 TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
 CAACTACCTGTTTGAGACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
 GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

>TIN1

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
TTCGGATGGTAAGATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATTCAGCAAATCGTC  
CTGAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAGTTGAG  
GTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
AGAGGCCTTCGTTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAG  
CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTCCTGGCGATACG  
TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
CAAACCTACCTGTTTGGACAGTAACCTCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

>TIN2

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
TTCGGATGGTAAGATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATTCAGCAAATCGTC  
CTAAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCGACTATAGATGTTTTAGTTGAG  
GTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
AGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAG  
CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTCCTGGCGATACG  
TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
CAAACCTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

>TIN3

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
TTCGGATGGTAAGATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATTCAGCAAATCGTC  
CTGAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAGTTGAG  
GTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
AGAGGCCTTCGTTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGCTACTCGTGATATCCGTTT  
TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAG  
CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTCCTGGCGATACG  
TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
CAAACCTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

>TIN4

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
TTCGGATGGTAAGATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATTCAGCAAATCGTC  
CTAAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCGACTATAGATGTTTTAGTTGAG  
GTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
AGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAATTTGATGAACAG  
CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTCCTGGCGATACG  
TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
CAAACCTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

>TIN5

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
TTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATTCAGCAAATCGTC  
CTGAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTGTAGTTGAG  
GTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
AGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAG  
CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTCCTGGCGATACG  
TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
CAAACCTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

>TIN6

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
TTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATTCAGCAAATCGTC  
CTGAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTGTAGTTGAG  
GTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
AGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAG  
CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTCCTGGCGATACG  
TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
CAAACCTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

>TIN7

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
TTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATTCAGCAAATCGTC  
CTGAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTGTAGTTGAG  
GTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
AGAGGCCTTCGTTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAG  
CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTCCTGGCGATACG  
TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
CAAACCTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

>TIN8

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
TTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATTCAGCAAATCGTC  
CTGAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTGTAGTTGAG  
GTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
AGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAG  
CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTCCTGGCGATACG  
TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
CAAACCTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

>TIN9

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
TTCGGATGGTAAAGATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT



ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTC  
CTAGATACAACCTAGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCGACTATAGATGTTTTAGTTGAG  
GTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
AGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAG  
CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATCTTGCGCATACG  
TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
CAAACCTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

>TIN10

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
TTCGGATGGTAAAGATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTC  
CTAAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAGTTGAG  
GTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
AGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAG  
CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATCTTGCGCATACG  
TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
CAAACCTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

>TIN11

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
TTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTC  
CTGAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAGTTGAG  
GTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
AGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAG  
CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATCTTGCGCATACG  
TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
CAAACCTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

>TIN12

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
TTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTC  
CTGAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT  
TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAGTTGAG  
GTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
AGAGGCCTTCGTTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTTTTGTTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAG  
CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATCTTGCGCATACG  
TTTCTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
CAAACCTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

>TIN13

TCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGATGATGTTATGGA  
TTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCT  
ACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTC  
CTGAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACACT

TTGTGTTTCTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAGTTGAG  
GTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTACCCGTAGATTCTTTGACAG  
AGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAAGTAGGTTTTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTT  
TTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTCAGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTGATGAACAG  
CCTTCTCAAGAATGTATTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATCTTGGCGATACG  
TTTCTGACGAGAAGAGTTTGAATTTATCCAGCTTATGCCCTTGACAATCCTGCCGCTATGTATACTGCTGCTGA  
CAAACCTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTGCTATGTAC  
GCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAA

Alineamiento de nucleótidos (CLUSTAL 2.1)

TIN11	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
TIN13	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
TIN8	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
TIN6	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
TIN5	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
TDE1	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
TIN1	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
TIN7	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
TIN3	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
TDE2	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
TIN12	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
PCO1	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
TIN2	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
AF178440	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
TIN4	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
TIN9	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
TIN10	TCAAAATAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATG	60
	*****	
TIN11	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
TIN13	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
TIN8	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
TIN6	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
TIN5	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
TDE1	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
TIN1	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
TIN7	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
TIN3	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
TDE2	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
TIN12	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
PCO1	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
TIN2	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
AF178440	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
TIN4	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
TIN9	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
TIN10	ATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCG	120
	*****	
TIN11	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
TIN13	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
TIN8	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
TIN6	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
TIN5	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
TDE1	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
TIN1	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
TIN7	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
TIN3	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
TDE2	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
TIN12	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
PCO1	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
TIN2	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180

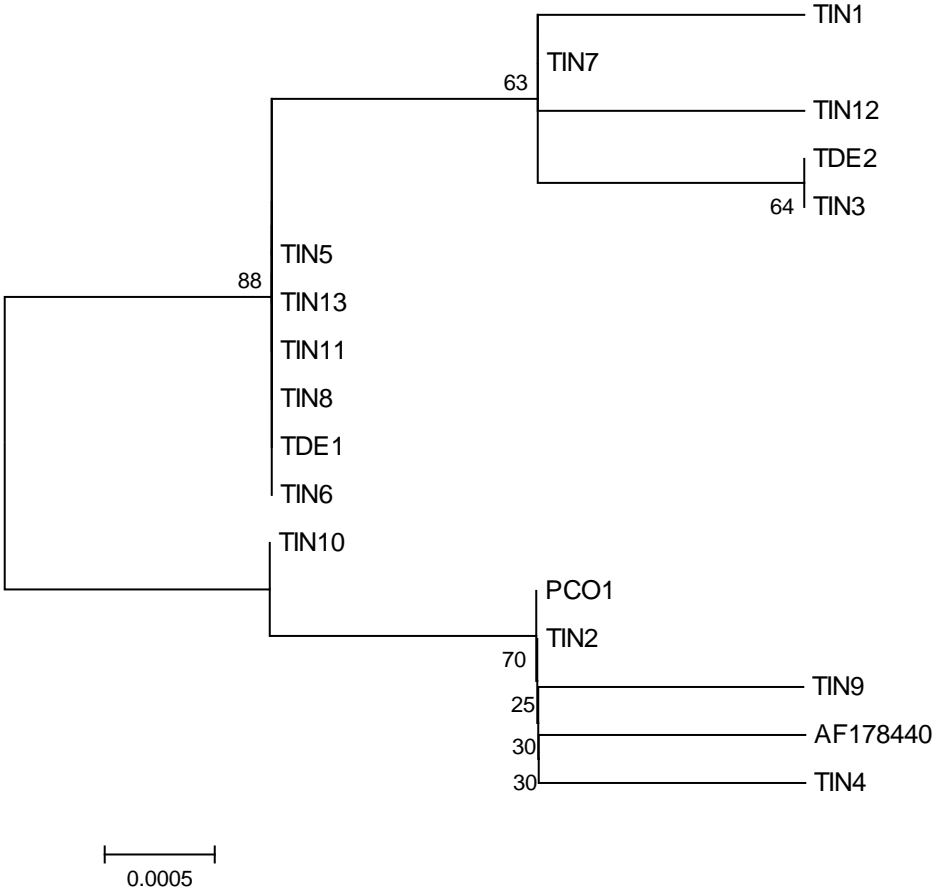
AF178440	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
TIN4	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
TIN9	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
TIN10	TAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTT	180
	*****	
TIN11	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAACATGAACCTA	240
TIN13	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAACATGAACCTA	240
TIN8	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAACATGAACCTA	240
TIN6	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAACATGAACCTA	240
TIN5	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAACATGAACCTA	240
TDE1	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAACATGAACCTA	240
TIN1	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAACATGAACCTA	240
TIN7	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAACATGAACCTA	240
TIN3	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAACATGAACCTA	240
TDE2	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAACATGAACCTA	240
TIN12	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAACATGAACCTA	240
PCO1	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTAAATACAACATGAACCTA	240
TIN2	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTAAATACAACATGAACCTA	240
AF178440	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTAAATACAACATGAACCTA	240
TIN4	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTAAATACAACATGAACCTA	240
TIN9	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTAGATACAACATGAACCTA	240
TIN10	ATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTAAATACAACATGAACCTA	240
	*****	
TIN11	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
TIN13	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
TIN8	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
TIN6	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
TIN5	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
TDE1	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
TIN1	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
TIN7	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
TIN3	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
TDE2	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
TIN12	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
PCO1	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
TIN2	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
AF178440	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
TIN4	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
TIN9	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
TIN10	GAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCCTTTACAGGAACACTTTGTGTTT	300
	*****	
TIN11	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAG	360
TIN13	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAG	360
TIN8	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAG	360
TIN6	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAG	360
TIN5	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAG	360
TDE1	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAG	360
TIN1	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAG	360
TIN7	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAG	360
TIN3	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAG	360
TDE2	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAG	360
TIN12	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAG	360
PCO1	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCGACTATAGATGTTTTAG	360
TIN2	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCGACTATAGATGTTTTAG	360
AF178440	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCGACTATAGATGTTTTAG	360
TIN4	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCGACTATAGATGTTTTAG	360
TIN9	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCGACTATAGATGTTTTAG	360
TIN10	CTGCTTTAACTCCTCTGGTTAGTAGTTCTGCCGTAGTCTCTTCAACTATAGATGTTTTAG	360
	*****	
TIN11	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
TIN13	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420

TIN8	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
TIN6	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
TIN5	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
TDE1	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
TIN1	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
TIN7	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
TIN3	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
TDE2	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
TIN12	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
PCO1	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
TIN2	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
AF178440	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
TIN4	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
TIN9	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
TIN10	TTGAGGTTAAAGCTTCAGATGATTTTGAAGTTGCTGTCCCAAACACGCCTTTATGGTTAC	420
*****		
TIN11	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
TIN13	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
TIN8	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
TIN6	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
TIN5	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
TDE1	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
TIN1	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
TIN7	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
TIN3	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
TDE2	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
TIN12	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
PCO1	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
TIN2	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
AF178440	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
TIN4	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
TIN9	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
TIN10	CCGTAGATTCTTTGACAGAGAGGCCTTCATTAGATGGTGTTCCTATTGCACAAGTAGGTT	480
*****		
TIN11	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
TIN13	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
TIN8	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
TIN6	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
TIN5	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
TDE1	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
TIN1	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
TIN7	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
TIN3	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
TDE2	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
TIN12	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
PCO1	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
TIN2	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
AF178440	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
TIN4	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
TIN9	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
TIN10	TTGCTTCAGCAGGTACTCGTGATATCCGTTCTTCTTATGTTGAGGGGAAATTTATTCCTC	540
*** *****		
TIN11	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
TIN13	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
TIN8	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
TIN6	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
TIN5	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
TDE1	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
TIN1	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
TIN7	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
TIN3	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
TDE2	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAACCTTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600

TIN12	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAAC TTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
PCO1	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAAC TTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
TIN2	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAAC TTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
AF178440	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAAC TTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
TIN4	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAATTTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
TIN9	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAAC TTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
TIN10	AGGATATAACTGGAATGTCTAGAAATCATGAAC TTGATGAACAGCCTTCTCAAGAATGTA	600
*****		
TIN11	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
TIN13	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
TIN8	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
TIN6	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
TIN5	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
TDE1	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
TIN1	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
TIN7	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
TIN3	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
TDE2	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
TIN12	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
PCO1	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
TIN2	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
AF178440	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
TIN4	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
TIN9	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
TIN10	TTGGTGAAAGAATCTTATCTTTTTCTGAATTGATTAAGAGAAATTTCTTGGCGATACGTTT	660
*****		
TIN11	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
TIN13	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
TIN8	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
TIN6	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
TIN5	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
TDE1	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
TIN1	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
TIN7	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
TIN3	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
TDE2	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
TIN12	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
PCO1	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
TIN2	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
AF178440	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
TIN4	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
TIN9	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
TIN10	CTGACGAGAAGAGTTTGATTTATCCAGCTTATGCCTTTGACAATCCTGCCGCTATGTATA	720
*****		
TIN11	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
TIN13	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
TIN8	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
TIN6	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
TIN5	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
TDE1	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
TIN1	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACAGTAACCTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
TIN7	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
TIN3	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
TDE2	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
TIN12	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
PCO1	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
TIN2	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
AF178440	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
TIN4	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
TIN9	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
TIN10	CTGCTGCTGACAAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGT	780
*****		

TIN11	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
TIN13	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
TIN8	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
TIN6	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
TIN5	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
TDE1	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
TIN1	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
TIN7	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
TIN3	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
TDE2	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
TIN12	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
PCO1	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
TIN2	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
AF178440	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
TIN4	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
TIN9	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
TIN10	TGACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGAATAAGGCTGAA	832
*****		

Árbol filogenético de nucleótidos



## Aminoácidos:

>AF178440

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
KYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVYV  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>PCO1

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
KYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVYV  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TDE1

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
EYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVYV  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TDE2

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
EYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVYV  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TIN1

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
EYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVYV  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TIN2

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
KYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVYV  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TIN3

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
EYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVYV  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TIN4

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
KYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHEFDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVYV  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TIN5

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
EYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVYV  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TIN6

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
EYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVY  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TIN7

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
EYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVY  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TIN8

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
EYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVY  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TIN9

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
RYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVY  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TIN10

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
KYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVY  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TIN11

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
EYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVY  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TIN12

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
EYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVY  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

>TIN13

KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNSANRP  
EYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLVEVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTE  
RPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRVY  
SDEKSLIYPAYAFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL

Alineamiento de aminoácidos (CLUSTAL 2.1)

TIN11	KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
TIN13	KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
TIN8	KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
TIN7	KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
TIN6	KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
TIN5	KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
TDE2	KTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60



TIN3	KTNYHSGRVQITFHFPVGYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
TDE1	KTNYHSGRVQITFHFPVGYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
TIN12	KTNYHSGRVQITFHFPVGYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
TIN1	KTNYHSGRVQITFHFPVGYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
TIN9	KTNYHSGRVQITFHFPVGYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
PCO1	KTNYHSGRVQITFHFPVGYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
TIN2	KTNYHSGRVQITFHFPVGYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
AF178440	KTNYHSGRVQITFHFPVGYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
TIN10	KTNYHSGRVQITFHFPVGYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
TIN4	KTNYHSGRVQITFHFPVGYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPY	60
*****		
TIN11	KVCADVFNNSANRPEYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
TIN13	KVCADVFNNSANRPEYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
TIN8	KVCADVFNNSANRPEYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
TIN7	KVCADVFNNSANRPEYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
TIN6	KVCADVFNNSANRPEYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
TIN5	KVCADVFNNSANRPEYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
TDE2	KVCADVFNNSANRPEYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
TIN3	KVCADVFNNSANRPEYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
TDE1	KVCADVFNNSANRPEYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
TIN12	KVCADVFNNSANRPEYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
TIN1	KVCADVFNNSANRPEYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
TIN9	KVCADVFNNSANRPRYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
PCO1	KVCADVFNNSANRPKYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
TIN2	KVCADVFNNSANRPKYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
AF178440	KVCADVFNNSANRPKYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
TIN10	KVCADVFNNSANRPKYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
TIN4	KVCADVFNNSANRPKYNYEPRDFKVDNTTDDQFFTGTLCVSALTPLVSSSAVVSSTIDVLV	120
*****		
TIN11	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
TIN13	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
TIN8	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
TIN7	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
TIN6	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
TIN5	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
TDE2	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
TIN3	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
TDE1	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
TIN12	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
TIN1	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
TIN9	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
PCO1	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
TIN2	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
AF178440	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
TIN10	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
TIN4	EVKASDDFEVAVPNTPLWLPVDSLTERPSLDGVPIAQVGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQ	180
*****		
TIN11	DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNSWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT	240
TIN13	DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNSWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT	240
TIN8	DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNSWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT	240
TIN7	DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNSWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT	240
TIN6	DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNSWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT	240
TIN5	DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNSWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT	240
TDE2	DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNSWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT	240
TIN3	DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNSWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT	240

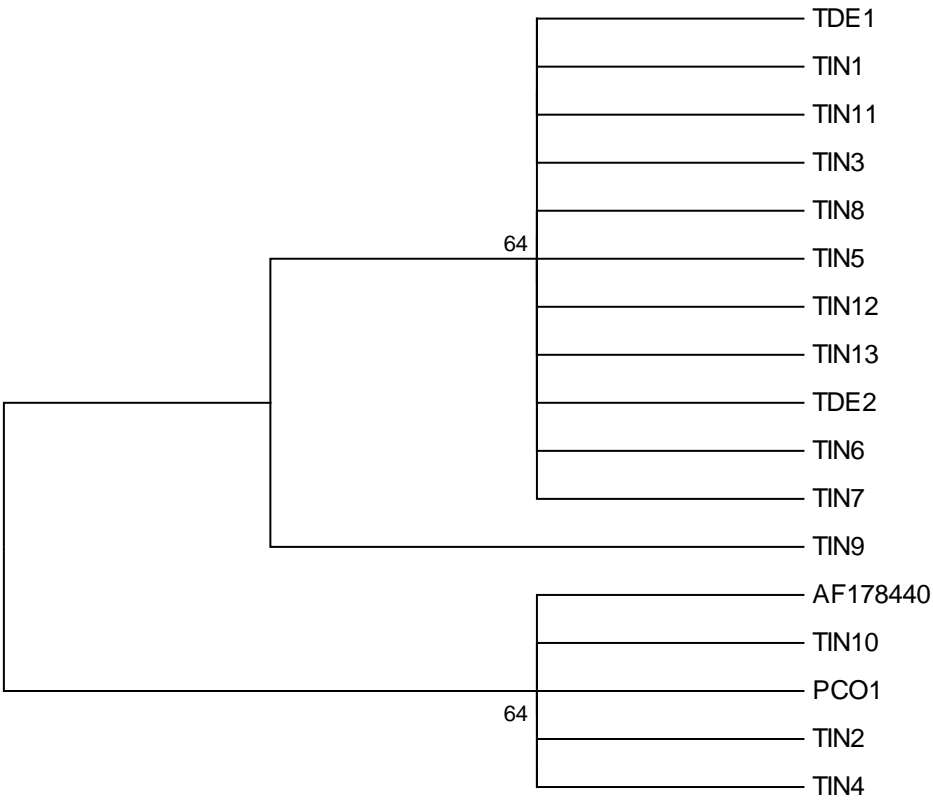
```

TDE1      DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT  240
TIN12     DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT  240
TIN1      DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT  240
TIN9      DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT  240
PCO1      DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT  240
TIN2      DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT  240
AF178440  DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT  240
TIN10     DITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT  240
TIN4      DITGMSRNHEFDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRYVSDEKSLIYPAYAFDNPAAMYT  240
          *****.*****

TIN11      AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
TIN13      AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
TIN8       AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
TIN7       AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
TIN6       AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
TIN5       AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
TDE2       AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
TIN3       AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
TDE1       AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
TIN12      AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
TIN1       AADKLPVWTVTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
TIN9       AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
PCO1       AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
TIN2       AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
AF178440   AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
TIN10      AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
TIN4       AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRL  276
          *****.*****

```

## Árbol filogenético de aminoácidos



**Región VP2-VP4****Nucleótidos y aminoácidos:**

&gt;AF178440

ATTTAGGCATACTTCTCAGGATGGCGCGTTGCAGTCCAACAAGATCCAGGGACTGTACAGAATTTTCCTATAC  
 CTCGAGTCGGGTTTGAATCTAAGGT**TGACTC**GCTGTAAATAATGTAAATATGAAACAAATGAATGTAAATTC  
 TTCTCAGGATACTACATTTGAACAAAAGATCTCAAGAGAAGGTGCAAGCTGGAGAAATTAATGAGAGTATTGAG  
 TTTCGAAATCAGATTACTACTTTTGTACATGATAATCCGATAATCACTGAGCAACTAATTGGAGATAGTCCAC  
 AGCCTTCGGGTGACGTTAGATCGGTTAGTGATGCTCGAACTCATTCTATTATTGATTTCTTAGAAAGACCCCA  
 GTTTATTGGATCTTTTCTTTGGAACACAAGTGATATTGAAAATAAAGAAATCTTTTCCTTGAAATTACCTGAT  
 GCACTTATGTCACCTATGATTAGAGAAAAATTATCTGGTTTTACATCTTTTAGTGCTAGTACCGTCTTTTCATA  
 TACAAGTAAATGCTCATCCATTTCAATGTGGAAGATTGGTTTTAGCTGCTGTACCTGTTCCAGATATTTTACC  
 TCTACATAGGTTGAACATGTTAAGTTTTGATGTTTCTAATGTCATAACTTTACCTCATGTGCAATTGGATATT  
 AGCAAGGAAACAGAAGTCTTATTGAAGATTCCCTTATGTTTCACCCTTTGTTCAGTATGATCTTGTTACAAAAT  
 TTACTCCTTGGGCTGCCTTTTGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGT  
 TAACGTGTTTGCTCATTTTGAAGACATCAAACAGGCTTTCCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAA  
 GAACAGTTAGGTCTTATAAGTGGTTTAACAAACACTGTTACGGGTGTTG

&gt;AF178440

LAVNNVNMKQMNVNSSQDTTFEQRSQEKVQAGEINESIEFRNQITTFVHDNPIIITEQLIGDSPQPSGDVRSVS  
 DARTHSIIDFLERPQFIGSFLWNTSDIENKEIFSLKLPDALMSPMIREKLSGFTSFSASTVFHIQVNAHPFQC  
 GRLVLAAPVVPDILPLHRLNMLSFDVSNVITLPHVQLDISKETEVLLKIPYVSPFVQYDLVTKFTPWAAFLAH  
 VYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGV

&gt;TIN1

ATTTAGGCATACTTCTCAGGATGGCGCGTTGCAGTCCAACAAGATCCAGGGACTGTACAGAATTTTCCTATAC  
 CTTGAGTCGGGTTTGAATCTAAGGT**TGACTC**GCTGTAAATAATGTAAATATGAAACAAATGAATGTAAATTC  
 TTCTCAGGATACTACATTTGAACAAAAGATCTCAAGAGAAGGTGCAAGCTGGAGAAATTAATGAGAGTATTGAG  
 TTTCGAAATCAGATTACTACTTTTGTAGATGATAATCCGATAATCACTGAGCAACTAATTGGAGATAGTCCAC  
 AGCCTTCGGGTGACGTTAGATCGGTTAGTGATGCTCGAACTCATTCTATTATTGATTTCTTAGAAAGACCCCA  
 GTTTATTGGATCTTTTCTTTGGAACACAAGTGATATTGAAAATAAAGAAATCTTTTCCTTGAAATTACCTGAT  
 GCACTTATGTCACCTATGATTAGAGAAAAATTATCTGGTTTTACATCTTTTAGTGCTAGTACCGTCTTTTCATA  
 TACAAGTAAATGCTCATCCATTTCAATGTGGAAGATTGGTTTTAGCTGCTGTACCTGTTCCAGATATTTTACC  
 TCTACATAGGTTGAACATGTTAAGTTTTGATGTTTCTAATGTCATAACTTTACCTCATGTGCAATTGGATATT  
 AGCAAGGAAACAGAAGTCTTATTGAAGATTCCCTTATGTTTCACCCTTTGTTCAGTATGATCTTGTTACAAAAT  
 TTACTCCTTGGGCTGCCTTTTGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGT  
 TAACGTGTTTGCTCATTTTGAAGACATCAAACAGGCTTTCCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAA  
 GAACAGTTAGGTCTTATAAGTGGTTTAACAAACACTGTTACGGGTGTTG

&gt;TIN1

LAVNNVNMKQMNVNSSQDTTFEQRSQEKVQAGEINESIEFRNQITTFVDDNPIIITEQLIGDSPQPSGDVRSVS  
 DARTHSIIDFLERPQFIGSFLWNTSDIENKEIFSLKLPDALMSPMIREKLSGFTSFSASTVFHIQVNAHPFQC  
 GRLVLAAPVVPDILPLHRLNMLSFDVSNVITLPHVQLDISKETEVLLKIPYVSPFVQYDLVTKFTPWAAFLAH  
 VYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGV

&gt;TIN4

ATTTAGGCATACTTCTCAGGATGGCGCGTTGCAGTCCAACAAGATCCAGGGACTGTACAGAATTTTCCTATAC  
 CTTGAGTCGGGTTTGAATCTAAAGT**TGACTC**GCTGTAAATAATGTAAATATGAAACAAATGAATGTAAATTC  
 TTCTCAGGATACTACATTTGAACAAAAGATCTCAAGAGAAGGTGCAAGCTGGAGAAATTAATGAGAGTATTGAG  
 TTTAGAAATCAGATTACTACTTTTGTAGATGATAATCCGATAATCACTGAGCAACTAATTGGAGATAGTCCAC  
 AGCCTTCGGGTGACGTTAGATCGGTTAGTGATGCTCGAACTCATTCTATTATTGATTTCTTAGAAAGACCCCA  
 GTTTATTGGATCTTTTCTTTGGAACACAAGTGATATTGAAAATAAAGAAATCTTTTCCTTGAAATTACCTGAT  
 GCACTTATGTCACCTATGATTAGAGAAAACTATCTGGTTTTACATCTTTTAGTGCTAGTACCGTCTTTTCATA  
 TACAAGTAAATGCTCATCCATTTCAATGTGGAAGATTGGTTTTAGCTGCTGTACCTGTTCCAGATATTTTACC  
 TCTACATAGGTTGAACATGTTAAGTTTTGATGTTTCTAATGTCATAACTTTACCTCATGTGCAATTGGATATT  
 AGCAAGGAAACAGAAGTCTTATTGAAGATTCCCTTATGTTTCACCCTTTGTTCAGTATGATCTTGTTACAAAAT

TTACTCCTTGGGCTGCCTTTTTGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGT  
TAACGTGTTTGCTCATTTTGAAGACATCAAAC TAGGCTTTCCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAA  
GAACAGTTAGGTCTATAAGTGGTTTAACAAACACTGTTACGGGTGTTG

>TIN4

LAVNNVNMKQMNVNSSQDTTFEQRSQEKVQAGEINESIEFRNQITTFVDDNPIIITEQLIGDSPQPSGDVRSVS  
DARTHSIIDFLERPQFIGSFLWNTSDIENKEIFSLKLPDALMSPMIREKLSGFTSFSASTVFHIVNAHPFQC  
GRLVLAAPVFPDILPLHRLNMLSFDVSNVITLPHVQLDISKETEVLLKIPYVSPFVQYDLVTKFTPWAAFLAH  
VYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGV

>TIN6

ATTTAGGCATACTTCTCAGGATGGCGCGTTGCAGTCCAACAAGATCCAGGGACTGTACAGAATTTTCCTATAC  
CTTGAGTCGGGTTTGAATCTAAGGT **TGACTC** GCTGTAAATAATGTAAATATGAAACAAATGAATGTAAATTC  
TTCTCAGGATACTACATTTGAACAAAGATCTCAAGAGAAGGTGCAAGCTGGAGAAATTAATGAGAGTATTGAG  
TTTCGAAATCAGATTACTACTTTTGTAGATGATAATCCGATAATCACTGAGCAACTAATTGGAGATAGTCCAC  
AGCCTTCGGGTGACGTTAGATCGGTTAGTGATGCTCGAACTCATTCTATTATTGATTTCTTAGAAAAGACCCCA  
GTTTATTGGATCTTTTCTTTGGAACACAAGTGATATTGAAAATAAAGAAATCTTTTCCTTGAAATTACCTGAT  
GCACTTATGTCACCTATGATTAGAGAAAAATTATCTGGTTTACATCTTTTAGTGCTAGTACCGTCTTTTCATA  
TACAAGTAAATGCTCATCCATTTCAATGTGGAAGATTGGTTTTAGCTGCTGTACCTGTTCCAGATATTTTACC  
TCTACATAGGTTGAACATGTTAAGTTTTGATGTTTCTAATGTCATAACTTTACCTCATGTGCAATTGGATATT  
AGCAAGGAAACAGAAGTCTTATTGAAGATTCCTTATGTTTCACCCTTTGTTTCAGTATGATCTTGTTACAAAAT  
TTACTCCTTGGGCTGCCTTTTTGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGT  
TAACGTGTTTGCTCATTTTGAAGACATCAAAC TAGGCTTTCCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAA  
GAACAGTTAGGTCTATAAGTGGTTTAACAAACACTGTTACGGGTGTTG

>TIN6

LAVNNVNMKQMNVNSSQDTTFEQRSQEKVQAGEINESIEFRNQITTFVDDNPIIITEQLIGDSPQPSGDVRSVS  
DARTHSIIDFLERPQFIGSFLWNTSDIENKEIFSLKLPDALMSPMIREKLSGFTSFSASTVFHIVNAHPFQC  
GRLVLAAPVFPDILPLHRLNMLSFDVSNVITLPHVQLDISKETEVLLKIPYVSPFVQYDLVTKFTPWAAFLAH  
VYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGV

>TIN8

ATTTAGGCATACTTCTCAGGATGGCGCGTTGCAGTCCAACAAGATCCAGGGACTGTACAGAATTTTCCTATAC  
CTTGAGTCGGGTTTGAATCTAAGGT **TGACTC** GCTGTAAATAATGTAAATATGAAACAAATGAATGTAAATTC  
TTCTCAGGATACTACATTTGAACAAAGATCTCAAGAGAAGGTGCAAGCTGGAGAAATTAATGAGAGTATTGAG  
TTTCGAAATCAGATTACTACTTTTGTAGATGATAATCCGATAATCACTGAGCAACTAATTGGAGATAGTCCAC  
AGCCTTCGGGTGACGTTAGATCGGTTAGTGATGCTCGAACTCATTCTATTATTGATTTCTTAGAAAAGACCCCA  
GTTTATTGGATCTTTTCTTTGGAACACAAGTGATATTGAAAATAAAGAAATCTTTTCCTTGAAATTACCTGAT  
GCACTTATGTCACCTATGATTAGAGAAAAATTATCTGGTTTACATCTTTTAGTGCTAGTACCGTCTTTTCATA  
TACAAGTAAATGCTCATCCATTTCAATGTGGAAGATTGGTTTTAGCTGCTGTACCTGTTCCAGATATTTTACC  
TCTACATAGGTTGAACATGTTAAGTTTTGATGTTTCTAATGTCATAACTTTACCTCATGTGCAATTGGATATT  
AGCAAGGAAACAGAAGTCTTATTGAAGATTCCTTATGTTTCACCCTTTGTTTCAGTATGATCTTGTTACAAAAT  
TTACTCCTTGGGCTGCCTTTTTGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAAGT  
TAACGTGTTTGCTCATTTTGAAGACATCAAAC TAGGCTTTCCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAA  
GAACAGTTAGGTCTATAAGTGGTTTAACAAACACTGTTACGGGTGTTG

>TIN8

LAVNNVNMKQMNVNSSQDTTFEQRSQEKVQAGEINESIEFRNQITTFVDDNPIIITEQLIGDSPQPSGDVRSVS  
DARTHSIIDFLERPQFIGSFLWNTSDIENKEIFSLKLPDALMSPMIREKLSGFTSFSASTVFHIVNAHPFQC  
GRLVLAAPVFPDILPLHRLNMLSFDVSNVITLPHVQLDISKETEVLLKIPYVSPFVQYDLVTKFTPWAAFLAH  
VYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGV

>TIN13

ATTTAGGCATACTTCTCAGGATGGCGCGTTGCAGTCCAACAAGATCCAGGGACTGTACAGAATTTTCCTATAC  
CTTGAGTCGGGTTTGAATCTAAGGT **TGACTC** GCTGTAAATAATGTAAATATGAAACAAATGAATGTAAATTC  
TTCTCAGGATACTACATTTGAACAAAGATCTCAAGAGAAGGTGCAAGCTGGAGAAATTAATGAGAGTATTGAG  
TTTCGAAATCAGATTACTACTTTTGTAGATGATAATCCGATAATCACTGAGCAACTAATTGGAGATAGTCCAC  
AGCCTTCGGGTGACGTTAGATCGGTTAGTGATGCTCGAACTCATTCTATTATTGATTTCTTAGAAAAGACCCCA

GTTTATTGGATCTTTTCTTTGGAACACAAGTGATATTGAAAATAAAGAAATCTTTTCCTTGAAATTACCTGAT  
GCACTTATGTCACCTATGATTAGAGAAAACTATCTGGTTTTACATCTTTTAGTGCTAGTACCGTCTTTTCATA  
TACAAGTAAATGCTCATCCATTTCAATGTGGAAGATTGGTTTTAGCTGCTGTACCTGTTCCAGATATTTTACC  
TCTACATAGGTTGAACATGTTAAGTTTTGATGTTTCTAATGTCATAACTTTACCTCATGTGCAATTGGATATT  
AGCAAGGAAAACAGAAGTCTTATTGAAGATTCCCTTATGTTTCACCTTTGTTTCAGTATGATCTTGTACAAAAT  
TTACTCCTTGGGCTGCCTTTTTGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGT  
TAACGTGTTTGTCTATTTTGAAGACATCAAACCTAGGCTTTCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAA  
GAACAGTTAGGTCTATAAGTGGTTTAAACAAACACTGTTACGGGTGTTG

>TIN13

LAVNNVNMKQMNVNSSQDITFEQRSQEKVQAGEINESIEFRNQITTFVDDNPIIITEQLIGDSPQPSGDVRSVS  
DARTHSIIDFLERPQFIGSFLWNTSDIENKEIFSLKLPDALMSPMIREKLSGFTSFSASTVFHIIQVNAHPFQC  
GRLVLAAPVVPDILPLHRLNMLSFDVSNVITLPHVQLDISKETEVLLKIPYVSPFVQYDLVTKFTPWAAFLAH  
VYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGV

Alineamiento de nucleótidos (CLUSTAL 2.1)

TIN1	ATTTAGGCATACTTCTCAGGATGGCGCGTTGCAGTCCAACAAGATCCAGGGACTGTACAG	60
AF178440	ATTTAGGCATACTTCTCAGGATGGCGCGTTGCAGTCCAACAAGATCCAGGGACTGTACAG	60
TIN6	ATTTAGGCATACTTCTCAGGATGGCGCGTTGCAGTCCAACAAGATCCAGGGACTGTACAG	60
TIN8	ATTTAGGCATACTTCTCAGGATGGCGCGTTGCAGTCCAACAAGATCCAGGGACTGTACAG	60
TIN13	ATTTAGGCATACTTCTCAGGATGGCGCGTTGCAGTCCAACAAGATCCAGGGACTGTACAG	60
TIN4	ATTTAGGCATACTTCTCAGGATGGCGCGTTGCAGTCCAACAAGATCCAGGGACTGTACAG	60
	*****	

TIN1	AATTTTCCTATACCTTGAGTCGGGTTTGAATCTAAGGTTGACTCGCTGTAAATAATGTA	120
AF178440	AATTTTCCTATACCTTGAGTCGGGTTTGAATCTAAGGTTGACTCGCTGTAAATAATGTA	120
TIN6	AATTTTCCTATACCTTGAGTCGGGTTTGAATCTAAGGTTGACTCGCTGTAAATAATGTA	120
TIN8	AATTTTCCTATACCTTGAGTCGGGTTTGAATCTAAGGTTGACTCGCTGTAAATAATGTA	120
TIN13	AATTTTCCTATACCTTGAGTCGGGTTTGAATCTAAGGTTGACTCGCTGTAAATAATGTA	120
TIN4	AATTTTCCTATACCTTGAGTCGGGTTTGAATCTAAGGTTGACTCGCTGTAAATAATGTA	120
	*****	

TIN1	AATATGAAACAAATGAATGTAAATCTTCTCAGGATACTACATTTGAACAAAGATCTCAA	180
AF178440	AATATGAAACAAATGAATGTAAATCTTCTCAGGATACTACATTTGAACAAAGATCTCAA	180
TIN6	AATATGAAACAAATGAATGTAAATCTTCTCAGGATACTACATTTGAACAAAGATCTCAA	180
TIN8	AATATGAAACAAATGAATGTAAATCTTCTCAGGATACTACATTTGAACAAAGATCTCAA	180
TIN13	AATATGAAACAAATGAATGTAAATCTTCTCAGGATACTACATTTGAACAAAGATCTCAA	180
TIN4	AATATGAAACAAATGAATGTAAATCTTCTCAGGATACTACATTTGAACAAAGATCTCAA	180
	*****	

TIN1	GAGAAGGTGCAAGCTGGAGAAATTAATGAGAGTATTGAGTTTCGAAATCAGATTACTACT	240
AF178440	GAGAAGGTGCAAGCTGGAGAAATTAATGAGAGTATTGAGTTTCGAAATCAGATTACTACT	240
TIN6	GAGAAGGTGCAAGCTGGAGAAATTAATGAGAGTATTGAGTTTCGAAATCAGATTACTACT	240
TIN8	GAGAAGGTGCAAGCTGGAGAAATTAATGAGAGTATTGAGTTTCGAAATCAGATTACTACT	240
TIN13	GAGAAGGTGCAAGCTGGAGAAATTAATGAGAGTATTGAGTTTCGAAATCAGATTACTACT	240
TIN4	GAGAAGGTGCAAGCTGGAGAAATTAATGAGAGTATTGAGTTTAGAAATCAGATTACTACT	240
	*****	

TIN1	TTTGTAGATGATAATCCGATAATCACTGAGCAACTAATTGGAGATAGTCCACAGCCTTCG	300
AF178440	TTTGTACATGATAATCCGATAATCACTGAGCAACTAATTGGAGATAGTCCACAGCCTTCG	300
TIN6	TTTGTAGATGATAATCCGATAATCACTGAGCAACTAATTGGAGATAGTCCACAGCCTTCG	300
TIN8	TTTGTAGATGATAATCCGATAATCACTGAGCAACTAATTGGAGATAGTCCACAGCCTTCG	300
TIN13	TTTGTAGATGATAATCCGATAATCACTGAGCAACTAATTGGAGATAGTCCACAGCCTTCG	300
TIN4	TTTGTAGATGATAATCCGATAATCACTGAGCAACTAATTGGAGATAGTCCACAGCCTTCG	300
	*****	

TIN1	GGTGACGTTAGATCGGTTAGTGATGCTCGAACTCATTCTATTATTGATTTCTTAGAAAGA	360
AF178440	GGTGACGTTAGATCGGTTAGTGATGCTCGAACTCATTCTATTATTGATTTCTTAGAAAGA	360
TIN6	GGTGACGTTAGATCGGTTAGTGATGCTCGAACTCATTCTATTATTGATTTCTTAGAAAGA	360
TIN8	GGTGACGTTAGATCGGTTAGTGATGCTCGAACTCATTCTATTATTGATTTCTTAGAAAGA	360

TIN13	GGTGACGTTAGATCGGTTAGTGATGCTCGAACTCATTCTATTATTGATTTCTTAGAAAGA	360
TIN4	GGTGACGTTAGATCGGTTAGTGATGCTCGAACTCATTCTATTATTGATTTCTTAGAAAGA	360
*****		
TIN1	CCCCAGTTTATTGGATCTTTTCTTTGGAACACAAGTGATATTGAAAATAAAGAAATCTTT	420
AF178440	CCCCAGTTTATTGGATCTTTTCTTTGGAACACAAGTGATATTGAAAATAAAGAAATCTTT	420
TIN6	CCCCAGTTTATTGGATCTTTTCTTTGGAACACAAGTGATATTGAAAATAAAGAAATCTTT	420
TIN8	CCCCAGTTTATTGGATCTTTTCTTTGGAACACAAGTGATATTGAAAATAAAGAAATCTTT	420
TIN13	CCCCAGTTTATTGGATCTTTTCTTTGGAACACAAGTGATATTGAAAATAAAGAAATCTTT	420
TIN4	CCCCAGTTTATTGGATCTTTTCTTTGGAACACAAGTGATATTGAAAATAAAGAAATCTTT	420
*****		
TIN1	TCCTTGAAATTACCTGATGCACCTTATGTCACCTATGATTAGAGAAAAATTATCTGGTTTT	480
AF178440	TCCTTGAAATTACCTGATGCACCTTATGTCACCTATGATTAGAGAAAAATTATCTGGTTTT	480
TIN6	TCCTTGAAATTACCTGATGCACCTTATGTCACCTATGATTAGAGAAAAATTATCTGGTTTT	480
TIN8	TCCTTGAAATTACCTGATGCACCTTATGTCACCTATGATTAGAGAAAAATTATCTGGTTTT	480
TIN13	TCCTTGAAATTACCTGATGCACCTTATGTCACCTATGATTAGAGAAAAATTATCTGGTTTT	480
TIN4	TCCTTGAAATTACCTGATGCACCTTATGTCACCTATGATTAGAGAAAAATTATCTGGTTTT	480
*****		
TIN1	ACATCTTTTAGTGCTAGTAGACCGTCTTTCATATACAAGTAAATGCTCATCCATTTCAATGT	540
AF178440	ACATCTTTTAGTGCTAGTAGACCGTCTTTCATATACAAGTAAATGCTCATCCATTTCAATGT	540
TIN6	ACATCTTTTAGTGCTAGTAGACCGTCTTTCATATACAAGTAAATGCTCATCCATTTCAATGT	540
TIN8	ACATCTTTTAGTGCTAGTAGACCGTCTTTCATATACAAGTAAATGCTCATCCATTTCAATGT	540
TIN13	ACATCTTTTAGTGCTAGTAGACCGTCTTTCATATACAAGTAAATGCTCATCCATTTCAATGT	540
TIN4	ACATCTTTTAGTGCTAGTAGACCGTCTTTCATATACAAGTAAATGCTCATCCATTTCAATGT	540
*****		
TIN1	GGAAGATTGGTTTTAGCTGCTGTACCTGTTCCAGATATTTTACCTCTACATAGGTTGAAC	600
AF178440	GGAAGATTGGTTTTAGCTGCTGTACCTGTTCCAGATATTTTACCTCTACATAGGTTGAAC	600
TIN6	GGAAGATTGGTTTTAGCTGCTGTACCTGTTCCAGATATTTTACCTCTACATAGGTTGAAC	600
TIN8	GGAAGATTGGTTTTAGCTGCTGTACCTGTTCCAGATATTTTACCTCTACATAGGTTGAAC	600
TIN13	GGAAGATTGGTTTTAGCTGCTGTACCTGTTCCAGATATTTTACCTCTACATAGGTTGAAC	600
TIN4	GGAAGATTGGTTTTAGCTGCTGTACCTGTTCCAGATATTTTACCTCTACATAGGTTGAAC	600
*****		
TIN1	ATGTTAAGTTTTGATGTTTCTAATGTCATAACTTTACCTCATGTGCAATTGGATATTAGC	660
AF178440	ATGTTAAGTTTTGATGTTTCTAATGTCATAACTTTACCTCATGTGCAATTGGATATTAGC	660
TIN6	ATGTTAAGTTTTGATGTTTCTAATGTCATAACTTTACCTCATGTGCAATTGGATATTAGC	660
TIN8	ATGTTAAGTTTTGATGTTTCTAATGTCATAACTTTACCTCATGTGCAATTGGATATTAGC	660
TIN13	ATGTTAAGTTTTGATGTTTCTAATGTCATAACTTTACCTCATGTGCAATTGGATATTAGC	660
TIN4	ATGTTAAGTTTTGATGTTTCTAATGTCATAACTTTACCTCATGTGCAATTGGATATTAGC	660
*****		
TIN1	AAGGAAACAGAAGTCTTATTGAAGATTCCTTATGTTTCACCCTTTGTTTCAGTATGATCTT	720
AF178440	AAGGAAACAGAAGTCTTATTGAAGATTCCTTATGTTTCACCCTTTGTTTCAGTATGATCTT	720
TIN6	AAGGAAACAGAAGTCTTATTGAAGATTCCTTATGTTTCACCCTTTGTTTCAGTATGATCTT	720
TIN8	AAGGAAACAGAAGTCTTATTGAAGATTCCTTATGTTTCACCCTTTGTTTCAGTATGATCTT	720
TIN13	AAGGAAACAGAAGTCTTATTGAAGATTCCTTATGTTTCACCCTTTGTTTCAGTATGATCTT	720
TIN4	AAGGAAACAGAAGTCTTATTGAAGATTCCTTATGTTTCACCCTTTGTTTCAGTATGATCTT	720
*****		
TIN1	GTTACAAAATTTACTCCTTGGGCTGCCTTTTTGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACT	780
AF178440	GTTACAAAATTTACTCCTTGGGCTGCCTTTTTGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACT	780
TIN6	GTTACAAAATTTACTCCTTGGGCTGCCTTTTTGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACT	780
TIN8	GTTACAAAATTTACTCCTTGGGCTGCCTTTTTGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACT	780
TIN13	GTTACAAAATTTACTCCTTGGGCTGCCTTTTTGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACT	780
TIN4	GTTACAAAATTTACTCCTTGGGCTGCCTTTTTGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACT	780
*****		
TIN1	CCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTTAACGTGTTTGCTCATTTTGAAGACATCAAAC TAGGC	840
AF178440	CCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTTAACGTGTTTGCTCATTTTGAAGACATCAAAC TAGGC	840
TIN6	CCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTTAACGTGTTTGCTCATTTTGAAGACATCAAAC TAGGC	840
TIN8	CCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTTAACGTGTTTGCTCATTTTGAAGACATCAAAC TAGGC	840
TIN13	CCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTTAACGTGTTTGCTCATTTTGAAGACATCAAAC TAGGC	840

```
TIN4      CCATCTGCTGCTTCATTGTCAGGTTAACGTGTTTGCTCATTTTGAAGACATCAAAC TAGGC  840
*****.*****

TIN1      TTTCCCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGTG GT  900
AF178440  TTTCCCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGTG GT  900
TIN6      TTTCCCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGTG GT  900
TIN8      TTTCCCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGTG GT  900
TIN13     TTTCCCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGTG GT  900
TIN4      TTTCCCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGTG GT  900
*****

TIN1      TTAACAAACACTGTTACGGGTGTTG  925
AF178440  TTAACAAACACTGTTACGGGTGTTG  925
TIN6      TTAACAAACACTGTTACGGGTGTTG  925
TIN8      TTAACAAACACTGTTACGGGTGTTG  925
TIN13     TTAACAAACACTGTTACGGGTGTTG  925
TIN4      TTAACAAACACTGTTACGGGTGTTG  925
*****
```

### Alineamiento de aminoácidos:

```
TIN8      LAVNNVNMKQMNVNSSQDTTFEQRSQEKVQAGEINESIEFRNQITTFVDDNPIITEQLIG  60
TIN13     LAVNNVNMKQMNVNSSQDTTFEQRSQEKVQAGEINESIEFRNQITTFVDDNPIITEQLIG  60
TIN6      LAVNNVNMKQMNVNSSQDTTFEQRSQEKVQAGEINESIEFRNQITTFVDDNPIITEQLIG  60
TIN4      LAVNNVNMKQMNVNSSQDTTFEQRSQEKVQAGEINESIEFRNQITTFVDDNPIITEQLIG  60
TIN1      LAVNNVNMKQMNVNSSQDTTFEQRSQEKVQAGEINESIEFRNQITTFVDDNPIITEQLIG  60
AF178440  LAVNNVNMKQMNVNSSQDTTFEQRSQEKVQAGEINESIEFRNQITTFVHDNPIITEQLIG  60
*****.*****

TIN8      DSPQPSGDVRSVSDARTHSHIIDFLERPQFIGSFLWNTSDIENKEIFSLKLPDALMSPMIR  120
TIN13     DSPQPSGDVRSVSDARTHSHIIDFLERPQFIGSFLWNTSDIENKEIFSLKLPDALMSPMIR  120
TIN6      DSPQPSGDVRSVSDARTHSHIIDFLERPQFIGSFLWNTSDIENKEIFSLKLPDALMSPMIR  120
TIN4      DSPQPSGDVRSVSDARTHSHIIDFLERPQFIGSFLWNTSDIENKEIFSLKLPDALMSPMIR  120
TIN1      DSPQPSGDVRSVSDARTHSHIIDFLERPQFIGSFLWNTSDIENKEIFSLKLPDALMSPMIR  120
AF178440  DSPQPSGDVRSVSDARTHSHIIDFLERPQFIGSFLWNTSDIENKEIFSLKLPDALMSPMIR  120
*****

TIN8      EKLSGFTSFASSTVFHIVNAHPFQCGRVLVLAAPVVPDILPLHRLNMLSFDVSNVITLPH  180
TIN13     EKLSGFTSFASSTVFHIVNAHPFQCGRVLVLAAPVVPDILPLHRLNMLSFDVSNVITLPH  180
TIN6      EKLSGFTSFASSTVFHIVNAHPFQCGRVLVLAAPVVPDILPLHRLNMLSFDVSNVITLPH  180
TIN4      EKLSGFTSFASSTVFHIVNAHPFQCGRVLVLAAPVVPDILPLHRLNMLSFDVSNVITLPH  180
TIN1      EKLSGFTSFASSTVFHIVNAHPFQCGRVLVLAAPVVPDILPLHRLNMLSFDVSNVITLPH  180
AF178440  EKLSGFTSFASSTVFHIVNAHPFQCGRVLVLAAPVVPDILPLHRLNMLSFDVSNVITLPH  180
*****

TIN8      VQLDISKETEVLLKIPYVSPFVQYDLVTKFTPWAAFLAHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHF  240
TIN13     VQLDISKETEVLLKIPYVSPFVQYDLVTKFTPWAAFLAHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHF  240
TIN6      VQLDISKETEVLLKIPYVSPFVQYDLVTKFTPWAAFLAHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHF  240
TIN4      VQLDISKETEVLLKIPYVSPFVQYDLVTKFTPWAAFLAHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHF  240
TIN1      VQLDISKETEVLLKIPYVSPFVQYDLVTKFTPWAAFLAHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHF  240
AF178440  VQLDISKETEVLLKIPYVSPFVQYDLVTKFTPWAAFLAHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHF  240
*****

TIN8      EDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGV  274
TIN13     EDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGV  274
TIN6      EDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGV  274
TIN4      EDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGV  274
TIN1      EDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGV  274
AF178440  EDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGV  274
*****
```



## **Región VP4-VP3**

Nucleótidos y aminoácidos:

>AF178440

TGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTAAACGTGTTTGCTCATTTTGA  
AGACATCAAACCTAGGCTTTTCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGT  
GGTTTAAACAAACACTGTTACGGGTGTTGTTGGAGGAGTTGCAGATGCTGTCAAGGGGTTTTTCCCTTCTATTG  
GAAAGTATGCCGATCCTCTGGTTGGAATTGGCAATGGTTTGAAGGTTATTGTGAGCTTTAGGTTTTTCCAA  
ACCTTTAACTACAATCCCGCCAACCTATTGTTGTTCAACGACCCTCTCAATATTTTAATAATGCTGATGGTGTA  
GATCAAGGACTTCCTTTGAGTCTTAAATATGGAAATGAGGTTATTTTGAAAACACCTTTTGCCGGAACATCTT  
CTGATGAGGTGGCGCTGGAGTATGTTTTAAAAATACCTAATTACTTTTCTAGATTTAAATACTCGAGTACGTC  
CTTACCTAAGCAAGTATTGTGGACTTCTCCTGTTTCATCCTCAAATAATACGTAATCACGTTACAGTTGTTGAT  
GCTCCAGGGCAGCCTACTTTGCTAGCTTATGCCACAGGATTTTTCAAATATTGGAGAGGTGGTCTCGTTTATA  
CGTTTAGATTTGTCAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGA  
TGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAGATAGTTAGAGATGAATACGTCCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGAC  
CAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATT  
CAGCAAATCGTCCTAAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTT  
TACAGGAACACTTTGTGTTTCTGCTTTA

>AF178440

AHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGVVGGVADAVKGGFFPSIG  
KYADPLVGIGNGLTGLLSALGFSKPLTTIPPTIVVQRPSQYFNNADGVDQGLPLSLKYGNEVILKTPFAGTSS  
DEVALEYVLKIPNYFSRFKYSSTSLPKQVLWTSVPVHPQIIRNHVTVDAPGQPTLLAYATGFFKYWRGGLVYT  
FRFVKTNYSGRVQITFHPFVGYYDDVMSDGIKVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNS  
ANRPKYNIEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSAL

>TIN1

TGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTAAACGTGTTTGCTCATTTTGA  
AGACATCAAACCTAGGCTTTTCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGT  
GGTTTAAACAAACACTGTTACGGGTGTTGTTGGAGGAGTTGCAGATGCTGTCAAGGGGTTTTTCCCTTCTATTG  
GAAAGTATGCCGACCCTCTGGTTGGAATTGGCAATGGTTTGAAGGTTATTGTGAGCTTTAGGTTTTTCCAA  
ACCTTTAACTACAATCCCGCCAACCTATTGTTGTTCAACGACCCTCTCAATATTTTAATAATGCTGATGGTGTA  
GATCAGGGACTTCCTTTGAGTCTTAAATATGGAAATGAGGTTATTTTGAAAACACCTTTTGCCGGAACATCTT  
CTGATGAGATGGCGCTGGAGTATGTTTTAAAAATACCTAATTACTTTTCTAGATTTAAATACTCGAGTACGTC  
CTTACCTAAGCAAGTATTGTGGACTTCTCCTGTTTCATCCTCAAATAATACGTAATCACGTTACAGTTGTTGAT  
GCTCCAGGGCAGCCTACTTTGCTGGCTTATGCCACAGGATTTTTCAAATATTGGAGAGGTGGTCTCGTTTATA  
CGTTTAGATTTATCAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGA  
TGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAAAAGTTAGAGATGAATACGTCCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGAC  
CAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATT  
CAGCAAATCGTCCTGAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTT  
TACAGGAACACTTTGTGTTTCTGCTTTA

>TIN1

AHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGVVGGVADAVKGGFFPSIG  
KYADPLVGIGNGLTGLLSALGFSKPLTTIPPTIVVQRPSQYFNNADGVDQGLPLSLKYGNEVILKTPFAGTSS  
DEMALEYVLKIPNYFSRFKYSSTSLPKQVLWTSVPVHPQIIRNHVTVDAPGQPTLLAYATGFFKYWRGGLVYT  
FRFIKTNYSGRVQITFHPFVGYYDDVMSDGIKVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNS  
ANRPEYNIEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSAL

>TIN4

TGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTAAACGTGTTTGCTCATTTTGA  
AGACATCAAACCTAGGCTTTTCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGT  
GGTTTAAACAAACACTGTTACGGGTGTTGTTGGAGGAGTTGCAGATGCTGTCAAGGGGTTTTTCCCTTCTATTG  
GAAAGTATGCCGATCCTCTGGTTGGAATTGGCAATGGTTTGAAGGTTATTGTGAGCTTTAGGTTTTTCCAA  
ACCTTTAACTACAATCCCGCCAACCTATTGTTGTTCAACGACCCTCTCAATATTTTAATAATGCTGATGGTGTA  
GATCAAGGACTTCCTTTGAGTCTTAAATATGGAAATGAGGTTATTTTGAAAACACCTTTTGCCGGAACATCTT

CTGATGAGATGGCGCTGGAGTATGTTTTAAAAATACCTAATTACTTTTCTAGATTTAAATACTCGAGTACGTC  
CTTACCTAAGCAAGTATTGTGGACTTCTCCTGTTTCATCCTCAAATAATACGTAATCACGTTACGGTTGTTGAT  
GCTCCAGGGCAGCCTACTTTGCTAGCTTATGCCACAGGATTTTTCAAATATTGGAGAGGTGGTCTCGTTTATA  
CGTTTAGATTTGTCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGA  
TGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAGATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGAC  
CAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATT  
CAGCAAATCGTCCTAAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTT  
TACAGGAACACTTTGTGTTTCTGCTTTA

>TIN4

AHVVYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGVVGGVADAVKGGFFPSIG  
KYADPLVGIGNGLTGLLSALGFSKPLTTIPPTIVVQRPSQYFNNADGVDQGLPLSLKYGNEVILKTPFAGTSS  
DEMALEYVLKIPNYFSRFKYSSTSLPKQVLWTSVPVHPQIIRNHVTVDAPGQPTLLAYATGFFKYWRGGLVYT  
FRFVKNTYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMSDGDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNS  
ANRPKYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSAL

>TIN6

TGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTAAACGTGTTTGCTCATTTTGA  
AGACATCAAACCTAGGCTTTTCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGT  
GGTTTAAACAAACACTGTTACGGGTGTTGTTGGAGGAGTTGCAGATGCTGTCAAGGGGTTTTTCCCTTCTATTG  
GAAAGTATGCCGATCCTCTGGTTGGAATTGGCAATGGTTTGACTGGGTATTGTGACGTTTAGGTTTTTCCAA  
ACCTTTAACTACAATCCCGCCAACCTATTGTTGTTCAACGACCCTCTCAATATTTTAATAATGCTGATGGTGTA  
GATCAAGGACTTCTTTGAGTCTTAAATATGGAAATGAGGTTATTTTGAAAACACCTTTTGCCGGAACATCTT  
CTGATGAGATGGCGCTGGAGTATGTTTTAAAAATACCTAATTACTTTTCTAGATTTAAATACTCGAGTACGTC  
CTTACCTAAGCAAGTATTGTGGACTTCTCCTGTTTCATCCTCAAATAATACGTAATCACGTTACAGTTGTTGAT  
GCTCCAGGGCAGCCTACTTTGCTAGCTTATGCCACAGGATTTTTCAAATATTGGAGAGGTGGTCTCGTTTATA  
CGTTTAGATTTGTCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGA  
TGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAGATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGAC  
CAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATT  
CAGCAAATCGTCCTGAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTT  
TACAGGAACACTTTGTGTTTCTGCTTTA

>TIN6

AHVVYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGVVGGVADAVKGGFFPSIG  
KYADPLVGIGNGLTGLLSALGFSKPLTTIPPTIVVQRPSQYFNNADGVDQGLPLSLKYGNEVILKTPFAGTSS  
DEMALEYVLKIPNYFSRFKYSSTSLPKQVLWTSVPVHPQIIRNHVTVDAPGQPTLLAYATGFFKYWRGGLVYT  
FRFVKNTYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMSDGDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNS  
ANRPEYNYEPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSAL

>TIN12

TGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTAAACGTGTTTGCTCATTTTGA  
AGACATCAAACCTAGGCTTTTCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGT  
GGTTTAAACAAACACTGTTACGGGTGTTGTTGGAGGAGTTGCAGATGCTGTCAAGGGGTTTTTCCCTTCTATTG  
GAAAGTATGCCGATCCTCTGGTTGGAATTGGCAATGGTTTGACTGGGTATTGTGACGTTTAGGTTTTTCCAA  
ACCTTTAACTACAATCCCGCCAACCTATTGTTGTTCAACGACCCTCTCAATATTTTAATAATGCTGATGGTGTA  
GATCAAGGACTTCTTTGAGTCTTAAATATGGAAATGAGGTTATTTTGAAAACACCTTTTGCCGGAACATCTT  
CTGATGAGATGGCGCTGGAGTATGTTTTAAAAATACCTAATTACTTTTCTAGATTTAAATACTCGAGTACGTC  
CTTACCTAAGCAAGTATTGTGGACTTCTCCTGTTTCATCCTCAAATAATACGTAATCACGTTACAGTTGTTGAT  
GCTCCAGGGCAGCCTACTTTGCTGGCTTATGCCACAGGATTTTTCAAATATTGGAGAGGTGGTCTCGTTTATA  
CGTTTAGATTTATCAAAACTAACTATCATTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGA  
TGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAGATAGTTAGAGATGAATACGTCTATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGAC  
CAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATT  
CAGCAAATCGTCCTGAATACAACCTATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTT  
TACAGGAACACTTTGTGTTTCTGCTTTA

>TIN12

AHVVYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGVVGGVADAVKGGFFPSIG  
KYADPLVGIGNGLTGLLSALGFSKPLTTIPPTIVVQRPSQYFNNADGVDQGLPLSLKYGNEVILKTPFAGTSS  
DEMALEYVLKIPNYFSRFKYSSTSLPKQVLWTSVPVHPQIIRNHVTVDAPGQPTLLAYATGFFKYWRGGLVYT

FRFIKTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNS  
ANRPEYNYEPRDFKVYDNTTDQFFTGTLCVSAL

>TIN13

TGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTTAACGTGTTTGCTCATTTTGA  
AGACATCAAACTAGGCTTTCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAGGTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGT  
GGTTTAAACAAACACTGTTACGGGTGTTGTTGGAGGAGTTGCAGATGCTGTCAAGGGGTTTTTCCCTTCTATTG  
GAAAGTATGCCGATCCTCTGGTTGGAATTGGCAATGGTTTGACTGGGTTATTGTCAGCTTTAGGTTTTTCCAA  
ACCTTTAACTACAATCCCGCCAACATATTGTTGTTCAACGACCCTCTCAATATTTTAAATAATGCTGATGGTGTA  
GATCAAGGACTTCCTTTGAGTCTTAAATATGGAAATGAGGTTATTTTGAAAACACCTTTTGCCGGAACATCTT  
CTGATGAGATGGCGCTGGAGTATGTTTTAAAAATACCTAATTACTTTTCTAGATTTAAATACTCGAGTACGTC  
CTTACCTAAGCAAGTATTGTGGACTTCTCCTGTTTCATCCTCAAATAATACGTAATCACGTTACAGTTGTTGAT  
GCTCCAGGGCAGCCTACTTTGCTAGCTTATGCCACAGGATTTTTCAAATATTGGAGAGGTGGTCTCGTTTATA  
CGTTTAGATTTGTCAAAACTAACTATCATTTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTGTTGGGTATGA  
TGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCATCGTGTAGTCGTAGACCTTCGTGAC  
CAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCCTTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAATT  
CAGCAAATCGTCCTGAATACAACATATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTT  
TACAGGAACACTTTGTGTTTCTGCTTTA

>TIN13

AHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFP TSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGVVGGVADAVKGFFPSIG  
KYADPLVGIGNLTGLLSALGFSKPLTTIPPTIVVQRPSQYFNNADGVDQGLPLSLKYGNEVILKTPFAGTSS  
DEMALEYVLKIPNYFSRKYSSLSLPKQVLWTSVPVHPQIIRNHVTVDAPGQPTLLAYATGFFKYWRGGLVYT  
FRFVKTNYHSGRVQITFHPFVGYYDDVMDSDGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFNS  
ANRPEYNYEPRDFKVYDNTTDQFFTGTLCVSAL

Alineamiento de nucleótidos (CLUSTAL 2.1)

TIN6	TGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTTAACGTGT	60
TIN13	TGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTTAACGTGT	60
AF178440	TGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTTAACGTGT	60
TIN4	TGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTTAACGTGT	60
TIN1	TGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTTAACGTGT	60
TIN12	TGGCACATGTGTATGCTCCTCTTAATACTCCATCTGCTGCTTCATTGCAGGTTAACGTGT	60
	*****	
TIN6	TTGCTCATTTTGAAGACATCAAACTAGGCTTTCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAG	120
TIN13	TTGCTCATTTTGAAGACATCAAACTAGGCTTTCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAG	120
AF178440	TTGCTCATTTTGAAGACATCAAACTAGGCTTTCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAG	120
TIN4	TTGCTCATTTTGAAGACATCAAACTAGGCTTTCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAG	120
TIN1	TTGCTCATTTTGAAGACATCAAACTAGGCTTTCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAG	120
TIN12	TTGCTCATTTTGAAGACATCAAACTAGGCTTTCTACTTCTGCTATTGTAGCTCAAGCAG	120
	*****	
TIN6	GTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGTGGTTTAAACAAACACTGTTACGGGTGTTGTTGGAG	180
TIN13	GTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGTGGTTTAAACAAACACTGTTACGGGTGTTGTTGGAG	180
AF178440	GTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGTGGTTTAAACAAACACTGTTACGGGTGTTGTTGGAG	180
TIN4	GTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGTGGTTTAAACAAACACTGTTACGGGTGTTGTTGGAG	180
TIN1	GTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGTGGTTTAAACAAACACTGTTACGGGTGTTGTTGGAG	180
TIN12	GTAAAGAACAGTTAGGTCCTATAAGTGGTTTAAACAAACACTGTTACGGGTGTTGTTGGAG	180
	*****	
TIN6	GAGTTGCAGATGCTGTCAAGGGGTTTTTCCCTTCTATTGGAAAGTATGCCGATCCTCTGG	240
TIN13	GAGTTGCAGATGCTGTCAAGGGGTTTTTCCCTTCTATTGGAAAGTATGCCGATCCTCTGG	240
AF178440	GAGTTGCAGATGCTGTCAAGGGGTTTTTCCCTTCTATTGGAAAGTATGCCGATCCTCTGG	240
TIN4	GAGTTGCAGATGCTGTCAAGGGGTTTTTCCCTTCTATTGGAAAGTATGCCGATCCTCTGG	240
TIN1	GAGTTGCAGATGCTGTCAAGGGGTTTTTCCCTTCTATTGGAAAGTATGCCGATCCTCTGG	240
TIN12	GAGTTGCAGATGCTGTCAAGGGGTTTTTCCCTTCTATTGGAAAGTATGCCGATCCTCTGG	240
	*****	

TIN6	TTGGAATTGGCAATGGTTTGACTGGGTTATTGTCAGCTTTAGGTTTTTCCAAACCTTTAA	300
TIN13	TTGGAATTGGCAATGGTTTGACTGGGTTATTGTCAGCTTTAGGTTTTTCCAAACCTTTAA	300
AF178440	TTGGAATTGGCAATGGTTTGACTGGGTTATTGTCAGCTTTAGGTTTTTCCAAACCTTTAA	300
TIN4	TTGGAATTGGCAATGGTTTGACTGGGTTATTGTCAGCTTTAGGTTTTTCCAAACCTTTAA	300
TIN1	TTGGAATTGGCAATGGTTTGACTGGGTTATTGTCAGCTTTAGGTTTTTCCAAACCTTTAA	300
TIN12	TTGGAATTGGCAATGGTTTGACTGGGTTATTGTCAGCTTTAGGTTTTTCCAAACCTTTAA	300
*****		
TIN6	CTACAATCCCGCCAACCTATTGTTGTTCAACGACCCCTCTCAATATTTTAATAATGCTGATG	360
TIN13	CTACAATCCCGCCAACCTATTGTTGTTCAACGACCCCTCTCAATATTTTAATAATGCTGATG	360
AF178440	CTACAATCCCGCCAACCTATTGTTGTTCAACGACCCCTCTCAATATTTTAATAATGCTGATG	360
TIN4	CTACAATCCCGCCAACCTATTGTTGTTCAACGACCCCTCTCAATATTTTAATAATGCTGATG	360
TIN1	CTACAATCCCGCCAACCTATTGTTGTTCAACGACCCCTCTCAATATTTTAATAATGCTGATG	360
TIN12	CTACAATCCCGCCAACCTATTGTTGTTCAACGACCCCTCTCAATATTTTAATAATGCTGATG	360
*****		
TIN6	GTGTAGATCAAGGACTTCCTTTGAGTCTTAAATATGGAAATGAGGTTATTTTGAAAACAC	420
TIN13	GTGTAGATCAAGGACTTCCTTTGAGTCTTAAATATGGAAATGAGGTTATTTTGAAAACAC	420
AF178440	GTGTAGATCAAGGACTTCCTTTGAGTCTTAAATATGGAAATGAGGTTATTTTGAAAACAC	420
TIN4	GTGTAGATCAAGGACTTCCTTTGAGTCTTAAATATGGAAATGAGGTTATTTTGAAAACAC	420
TIN1	GTGTAGATCAAGGACTTCCTTTGAGTCTTAAATATGGAAATGAGGTTATTTTGAAAACAC	420
TIN12	GTGTAGATCAAGGACTTCCTTTGAGTCTTAAATATGGAAATGAGGTTATTTTGAAAACAC	420
*****		
TIN6	CCTTTGCCGGAACATCTTCTGATGAGATGGCGCTGGAGTATGTTTTAAAAATACCTAATT	480
TIN13	CCTTTGCCGGAACATCTTCTGATGAGATGGCGCTGGAGTATGTTTTAAAAATACCTAATT	480
AF178440	CCTTTGCCGGAACATCTTCTGATGAGATGGCGCTGGAGTATGTTTTAAAAATACCTAATT	480
TIN4	CCTTTGCCGGAACATCTTCTGATGAGATGGCGCTGGAGTATGTTTTAAAAATACCTAATT	480
TIN1	CCTTTGCCGGAACATCTTCTGATGAGATGGCGCTGGAGTATGTTTTAAAAATACCTAATT	480
TIN12	CCTTTGCCGGAACATCTTCTGATGAGATGGCGCTGGAGTATGTTTTAAAAATACCTAATT	480
*****		
TIN6	ACTTTTCTAGATTTAAATACTCGAGTACGTCCTTACCTAAGCAAGTATTGTGGACTTCTC	540
TIN13	ACTTTTCTAGATTTAAATACTCGAGTACGTCCTTACCTAAGCAAGTATTGTGGACTTCTC	540
AF178440	ACTTTTCTAGATTTAAATACTCGAGTACGTCCTTACCTAAGCAAGTATTGTGGACTTCTC	540
TIN4	ACTTTTCTAGATTTAAATACTCGAGTACGTCCTTACCTAAGCAAGTATTGTGGACTTCTC	540
TIN1	ACTTTTCTAGATTTAAATACTCGAGTACGTCCTTACCTAAGCAAGTATTGTGGACTTCTC	540
TIN12	ACTTTTCTAGATTTAAATACTCGAGTACGTCCTTACCTAAGCAAGTATTGTGGACTTCTC	540
*****		
TIN6	CTGTTTCATCCTCAAATAATACGTAATCACGTTACAGTTGTTGATGCTCCAGGGCAGCCTA	600
TIN13	CTGTTTCATCCTCAAATAATACGTAATCACGTTACAGTTGTTGATGCTCCAGGGCAGCCTA	600
AF178440	CTGTTTCATCCTCAAATAATACGTAATCACGTTACAGTTGTTGATGCTCCAGGGCAGCCTA	600
TIN4	CTGTTTCATCCTCAAATAATACGTAATCACGTTACGTTGTTGATGCTCCAGGGCAGCCTA	600
TIN1	CTGTTTCATCCTCAAATAATACGTAATCACGTTACAGTTGTTGATGCTCCAGGGCAGCCTA	600
TIN12	CTGTTTCATCCTCAAATAATACGTAATCACGTTACAGTTGTTGATGCTCCAGGGCAGCCTA	600
*****		
TIN6	CCTTGCTAGCTTATGCCACAGGATTTTTCAAATATTGGAGAGGTGGTCTCGTTTATACGT	660
TIN13	CCTTGCTAGCTTATGCCACAGGATTTTTCAAATATTGGAGAGGTGGTCTCGTTTATACGT	660
AF178440	CCTTGCTAGCTTATGCCACAGGATTTTTCAAATATTGGAGAGGTGGTCTCGTTTATACGT	660
TIN4	CCTTGCTAGCTTATGCCACAGGATTTTTCAAATATTGGAGAGGTGGTCTCGTTTATACGT	660
TIN1	CCTTGCTGGCTTATGCCACAGGATTTTTCAAATATTGGAGAGGTGGTCTCGTTTATACGT	660
TIN12	CCTTGCTGGCTTATGCCACAGGATTTTTCAAATATTGGAGAGGTGGTCTCGTTTATACGT	660
*****		
TIN6	TTAGATTTGTCAAACTAACTATCATTTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTG	720
TIN13	TTAGATTTGTCAAACTAACTATCATTTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTG	720
AF178440	TTAGATTTGTCAAACTAACTATCATTTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTG	720
TIN4	TTAGATTTGTCAAACTAACTATCATTTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTG	720
TIN1	TTAGATTTATCAAACTAACTATCATTTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTG	720
TIN12	TTAGATTTATCAAACTAACTATCATTTCTGGAAGAGTCCAAATTACATTTTCATCCCTTTG	720
*****		
TIN6	TTGGGTATGATGATGTTATGGATTTCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATC	780

TIN13	TTGGGTATGATGATGTTATGGATTCCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATC	780
AF178440	TTGGGTATGATGATGTTATGGATTCCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATC	780
TIN4	TTGGGTATGATGATGTTATGGATTCCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATC	780
TIN1	TTGGGTATGATGATGTTATGGATTCCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATC	780
TIN12	TTGGGTATGATGATGTTATGGATTCCGGATGGTAAATAGTTAGAGATGAATACGTCTATC	780
*****		
TIN6	GTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCC	840
TIN13	GTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCC	840
AF178440	GTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCC	840
TIN4	GTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCC	840
TIN1	GTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCC	840
TIN12	GTGTAGTCGTAGACCTTCGTGACCAGACTGAGGCTACTTTAGTAGTCCCTTTTACCTCCC	840
*****		
TIN6	TTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAAC	900
TIN13	TTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAAC	900
AF178440	TTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAAC	900
TIN4	TTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAAC	900
TIN1	TTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAAC	900
TIN12	TTACTCCTTATAAAGTGTGTGCGGATGTGTTTAAATTCAGCAAATCGTCCTGAATACAAC	900
*****		
TIN6	ATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACAC	960
TIN13	ATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACAC	960
AF178440	ATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACAC	960
TIN4	ATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACAC	960
TIN1	ATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACAC	960
TIN12	ATGAACCTAGAGACTTTAAGGTTTATGATAATACTACAGATCAGTTCTTTACAGGAACAC	960
*****		
TIN6	TTTGTGTTTCTGCTTTA	977
TIN13	TTTGTGTTTCTGCTTTA	977
AF178440	TTTGTGTTTCTGCTTTA	977
TIN4	TTTGTGTTTCTGCTTTA	977
TIN1	TTTGTGTTTCTGCTTTA	977
TIN12	TTTGTGTTTCTGCTTTA	977
*****		
Alineamiento de aminoácidos (CLUSTAL 2.1)		
TIN1	AHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFPSTSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGVVGG	60
TIN12	AHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFPSTSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGVVGG	60
TIN6	AHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFPSTSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGVVGG	60
TIN13	AHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFPSTSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGVVGG	60
AF178440	AHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFPSTSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGVVGG	60
TIN4	AHVYAPLNTPSAASLQVNVFAHFEDIKLGFPSTSAIVAQAGKEQLGPISGLTNTVTGVVGG	60
*****		
TIN1	VADAVKGFFPSIGKYADPLVGIGNLTGLLSALGFSKPLTTIPPTIVVQRPSQYFNNADG	120
TIN12	VADAVKGFFPSIGKYADPLVGIGNLTGLLSALGFSKPLTTIPPTIVVQRPSQYFNNADG	120
TIN6	VADAVKGFFPSIGKYADPLVGIGNLTGLLSALGFSKPLTTIPPTIVVQRPSQYFNNADG	120
TIN13	VADAVKGFFPSIGKYADPLVGIGNLTGLLSALGFSKPLTTIPPTIVVQRPSQYFNNADG	120
AF178440	VADAVKGFFPSIGKYADPLVGIGNLTGLLSALGFSKPLTTIPPTIVVQRPSQYFNNADG	120
TIN4	VADAVKGFFPSIGKYADPLVGIGNLTGLLSALGFSKPLTTIPPTIVVQRPSQYFNNADG	120
*****		
TIN1	VDQGLPLSLKYGNEVILKTPFAGTSSDEMALEYVLKIPNYFSRFKYSSTSLPKQVLWTSP	180
TIN12	VDQGLPLSLKYGNEVILKTPFAGTSSDEMALEYVLKIPNYFSRFKYSSTSLPKQVLWTSP	180
TIN6	VDQGLPLSLKYGNEVILKTPFAGTSSDEMALEYVLKIPNYFSRFKYSSTSLPKQVLWTSP	180
TIN13	VDQGLPLSLKYGNEVILKTPFAGTSSDEMALEYVLKIPNYFSRFKYSSTSLPKQVLWTSP	180
AF178440	VDQGLPLSLKYGNEVILKTPFAGTSSDEMALEYVLKIPNYFSRFKYSSTSLPKQVLWTSP	180
TIN4	VDQGLPLSLKYGNEVILKTPFAGTSSDEMALEYVLKIPNYFSRFKYSSTSLPKQVLWTSP	180

```

*****:*****

TIN1      VHPQIIRNHVTVVDAPGQPTLLAYATGFFKYWRGGLVYTFRFIKTNYHSGRVQITFHFPV  240
TIN12     VHPQIIRNHVTVVDAPGQPTLLAYATGFFKYWRGGLVYTFRFIKTNYHSGRVQITFHFPV  240
TIN6      VHPQIIRNHVTVVDAPGQPTLLAYATGFFKYWRGGLVYTFRFVKTNYHSGRVQITFHFPV  240
TIN13     VHPQIIRNHVTVVDAPGQPTLLAYATGFFKYWRGGLVYTFRFVKTNYHSGRVQITFHFPV  240
AF178440  VHPQIIRNHVTVVDAPGQPTLLAYATGFFKYWRGGLVYTFRFVKTNYHSGRVQITFHFPV  240
TIN4      VHPQIIRNHVTVVDAPGQPTLLAYATGFFKYWRGGLVYTFRFVKTNYHSGRVQITFHFPV  240
*****:*****

TIN1      GYDDVMDSGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFN SANRPEYNY  300
TIN12     GYDDVMDSGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFN SANRPEYNY  300
TIN6      GYDDVMDSGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFN SANRPEYNY  300
TIN13     GYDDVMDSGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFN SANRPEYNY  300
AF178440  GYDDVMDSGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFN SANRPKYNY  300
TIN4      GYDDVMDSGKIVRDEYVYRVVVDLRDQTEATLVVPFTSLTPYKVCADVFN SANRPKYNY  300
*****:***

TIN1      EPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSAL  325
TIN12     EPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSAL  325
TIN6      EPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSAL  325
TIN13     EPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSAL  325
AF178440  EPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSAL  325
TIN4      EPRDFKVDNTTDQFFTGTLCVSAL  325
*****

```

## Region VP1

### Nucleótidos y aminoácidos:

```
>AF178440
GCTGCTGACAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTG
CTATGTACGCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAAGATTGTTCCCGGTGTTGCCGATCAACCTAAACCTCT
GGTAGAAGTGGCTTTGTTTACTATGCAGGATCAAGGCTATATCATTAAAGCTAATGATTATAGCACTGATTTT
TGCTCGTCGAATATATATGAAAATTTTGTACTAAAGGAATAGCAGAGGTACAAACTCCTTATTATTCAAGGG
TTAATACCTCTGTTGTTTCTGCTCCTGTCTTTATAACGCAGGTAATATTTCTCCACTAATGCCGAATGTTAT
GTATAAGATAACATCAAATTCATCAAACATTCTGCTTGGTCATTCTGCTGCTGATGATTTCCGTTTTGGATTT
CTCTTGGGAGCTCCATTAGCTATTTTCTGCTACGGCTCTTAGAGATAACTTTACGGGATCCTCTGCTACAGTTT
CTCTTCCTACCTTCTCAAATTTTATCTATCTTCGACTTCAGAGTCCACTACTTACAGGCTAGTGGTTGTTTCG
TACATTGGGTCAAGACTCAGTCTTGTGTTTTCCGTATGTAAATATAAATATACATTCAATTTATTGTAAATAATT
ATATATATATAATTTTGTGTTTGTGTAATAATGTGCTTTTATATGTTTGTGCTGTGCTCTTTCAGGTTTCTT
CTTGATTCTTCTGAGGGTACTAATCGAATCATGTATTTTGTGTTTATTATTATATACGTTTTTGTTCGCTTTG
TCCGTTTCAGTGGACCAAGTTTT
```

```
>AF178440
VGFASAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRYVSDEKSLIYPAY
AFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRLKIVPGVADQPKPLVEVALFTMQDQGYI
IKANDYSTDFCSSNIYENFVTKGIAEVQTPYYSRVNTSVVSAPVLYNAGNISPLMPNVMYKITSNSSNILLGH
SAADDFRFGFLLGAPLAISATALRDNFTGSSATVSLPTFSNFYLSSTSESTT*
```

```
>TIN12
GCTGCTGACAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTGACATCTATTGGTG
CTATGTACGCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAAGATTGTTCCCGGTGTTGCCGATCAACCTAAACCTCT
GGTAGAAGTGGCTTTGTTTACTATGCAGGATCAAGGCTATATCATTAAAGCTAATGATTATAGCACTGATTTT
TGCTCGTCGAATATATATGAAAATTTTGTACTAAAGGAATAGCAGAGGTACAAACTCCTTATTATTCAAGGG
TTAATACCTCTGTTGTTTCTGCTCCTGTCTTTATAACGCAGGTAATATTTCTCCACTAATGCCGAATGTTAT
GTATAAGATAACATCAAATTCATCAAACATTCTGCTTGGTCATTCTGCTGCTGATGATTTCCGTTTTGGATTT
CTCTTGGGAGCTCCATTAGCTATTTTCTGCTACGGCTCTTAGAGATAACTTTACGGGATCCTCTGCTACAGTTT
CTCTTCCTACCTTCTCAAATTTTATCTATCTTCGACTTCAGAGTCCACTACTTACAGGCTAGTGGTTGTTTCG
TACATTGGGTCAAGACTCAGTCTTGTGTTTTCCGTATGTAAATATAAATATACATTCAATTTATTGTAAATAATT
ATATATATATAGGTTTTGTTTGTGTAATAATGTGCTTTTATATGTTTGTGCTGTGCTCTTTCAGGTTTCTT
CTTGATTCTTCTGAGGGTACTAATCGAATCATGTATTTTGTGTTTATTATTATATACGTTTTTGTTCGCTTTG
TCCGTTTCAGTGGACCAAGTTTT
```

```
>TIN12
VGFVSAGTRDIRSSYVEGKFIPQDITGMSRNHELDEQPSQECIGERILSFSELIKRNWRYVSDEKSLIYPAY
AFDNPAAMYTAADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRLKIVPGVADQPKPLVEVALFTMQDQGYI
IKANDYSTDFCSSNIYENFVTKGIAEVQTPYYSRVNTSVVSAPVLYNAGNISPLMPNVMYKITSNSSNILLGH
SAADDFRFGFLLGAPLAISATALRDNFTGSSATVSLPTFSNFYLSSTSESTT
```

### Alineamiento de nucleótidos (CLUSTAL 2.1)

TIN12	GCTGCTGACAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTG	60
AF178440	GCTGCTGACAACTACCTGTTTGGACACTAACTCCTAGATCGGGTTTTCCCACTCTGTTG	60
	*****	
TIN12	ACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAAGATTGTTCCC	120
AF178440	ACATCTATTGGTGCTATGTACGCATTTTATAGGGGGGGAATAAGGCTGAAGATTGTTCCC	120
	*****	
TIN12	GGTGTTGCCGATCAACCTAAACCTCTGGTAGAAGTGGCTTTGTTTACTATGCAGGATCAA	180
AF178440	GGTGTTGCCGATCAACCTAAACCTCTGGTAGAAGTGGCTTTGTTTACTATGCAGGATCAA	180
	*****	

TIN12	GGCTATATCATTTAAAGCTAATGATTATAGCACTGATTTCTGCTCGTGAATATATATGAA	240
AF178440	GGCTATATCATTTAAAGCTAATGATTATAGCACTGATTTCTGCTCGTGAATATATATGAA	240
*****		
TIN12	AATTTTGTTACTAAAGGAATAGCAGAGGTACAACTCCTTATTATTCAGGGTTAATACC	300
AF178440	AATTTTGTTACTAAAGGAATAGCAGAGGTACAACTCCTTATTATTCAGGGTTAATACC	300
*****		
TIN12	TCTGTTGTTTCTGCTCCTGTTCTTTATAACGCAGGTAATATTTCTCCACTAATGCCGAAT	360
AF178440	TCTGTTGTTTCTGCTCCTGTTCTTTATAACGCAGGTAATATTTCTCCACTAATGCCGAAT	360
*****		
TIN12	GTTATGTATAAGATAACATCAAATTCATCAAACATTCTGCTTGGTCATTCTGCTGCTGAT	420
AF178440	GTTATGTATAAGATAACATCAAATTCATCAAACATTCTGCTTGGTCATTCTGCTGCTGAT	420
*****		
TIN12	GATTTCCGTTTTGGATTTCTCTTGGGAGCTCCATTAGCTATTTCTAGCTACGGCTCTTAGA	480
AF178440	GATTTCCGTTTTGGATTTCTCTTGGGAGCTCCATTAGCTATTTCTAGCTACGGCTCTTAGA	480
*****		
TIN12	GATAACTTTACGGGATCCTCTGCTACAGTTTCTCTTCCCTACCTTCTCAAATTTTTATCTA	540
AF178440	GATAACTTTACGGGATCCTCTGCTACAGTTTCTCTTCCCTACCTTCTCAAATTTTTATCTA	540
*****		
TIN12	TCTTCGACTTCAGAGTCCACTACTTAGAGGCTAGTGGTTGTTTCGTACATTGGGTCAAGAC	600
AF178440	TCTTCGACTTCAGAGTCCACTACTTAGAGGCTAGTGGTTGTTTCGTACATTGGGTCAAGAC	600
*****		
TIN12	TCAGTCTTGTTTTCCGTATGTAAATATAAATATACATTCATTTATTGTAAATAATTATA	660
AF178440	TCAGTCTTGTTTTCCGTATGTAAATATAAATATACATTCATTTATTGTAAATAATTATA	660
*****		
TIN12	TATATATGGTTTTGTTTGTGTTGTAAATAATGTGCTTTTATATGTTTGTGTCTGTGTCTTT	720
AF178440	TATATATAATTTTGTGTTGTTGTAAATAATGTGCTTTTATATGTTTGTGTCTGTGTCTTT	720
*****		
TIN12	CAGGTTTCTTCTTGATTCTTCCTGAGGGTACTAATCGAATCATGTATTTGTTTTATTAT	780
AF178440	CAGGTTTCTTCTTGATTCTTCCTGAGGGTACTAATCGAATCATGTATTTGTTTTATTAT	780
*****		
TIN12	TATATACGTTTTTGTTCGCTTTGTCCGTTTCAGTGGACCAAGTTTT	825
AF178440	TATATACGTTTTTGTTCGCTTTGTCCGTTTCAGTGGACCAAGTTTT	825
*****		

Alineamiento de aminoácidos (CLUSTAL 2.1)

AF	AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRLKIVPGVADQPKPLVEVALFTMQDQ	60
TIN12	AADKLPVWTLTPRSGFPTLLTSIGAMYAFYRGGIRLKIVPGVADQPKPLVEVALFTMQDQ	60
*****		
AF	GYIIKANDYSTDFCSSNIYENFVTKGIAEVQTPYYSRVNTSVVSAPVLYNAGNISPLMPN	120
TIN12	GYIIKANDYSTDFCSSNIYENFVTKGIAEVQTPYYSRVNTSVVSAPVLYNAGNISPLMPN	120
*****		
AF	VMYKITSNSSNILLGHSAAADDFRFGFLLGAPLAISATALRDNFTGSSATVSLPTFSNFYL	180
TIN12	VMYKITSNSSNILLGHSAAADDFRFGFLLGAPLAISATALRDNFTGSSATVSLPTFSNFYL	180
*****		
AF	SSTSESTT	188
TIN12	SSTSESTT	188
*****		



### CAPÍTULO III

## REPLICACIÓN DE TRV EN CULTIVOS CELULARES

### 3.1- ANTECEDENTES

Contar con líneas o cultivos celulares sensibles a la infección con TrV, podría traer grandes ventajas: permitirá aislar, caracterizar y estudiar en profundidad la biología del virus con el fin de obtener masa viral que podría ser utilizado como agente de control biológico. Si bien los ejemplos citados en la literatura hacen referencia al control biológico para plagas, no es arriesgado pensar en utilizar agentes de control biológico para eliminar vectores de enfermedades de gran prevalencia mundial y de alto impacto en la salud. Los virus son asociados con los insectos en un amplio rango de relaciones ecológicas: como patógenos, como vectores y como simbioses (Christian y Scotti 2008).

Existen al menos, catorce familias virales con representantes patógenos para invertebrados y algunas de estas familias poseen virus que ya han sido investigadas como agentes de control biológico para insectos. *Dicistroviridae* (Fig. 3a) es una de las familias propuestas para este fin (Erlandson M., 2008). Como describe Bonning y Miller, ocho miembros de la familia *Dicistroviridae* se reconocen patógenos a insectos plaga de cultivos (CrPV, ALPV, RhPV, PSIV, HiPV, HoCV-1, SINV-1) o de importancia médica (TrV y SINV-1) (Bonning y Miller, 2010). Por lo tanto podrían ser utilizados como agentes de control biológico de acuerdo a su importancia. En Estados Unidos ante la invasión de la hormiga roja de fuego (*Solenopsis invicta*) y de la chicharra de alas cristalinas (*Homalodisca coagulata*), el uso de *Dicistrovirus* como biopesticidas está siendo considerado, debido al alto costo como resultado del tratamiento de las víctimas afectadas, la pérdida de animales y grandes pérdidas en los viñedos.

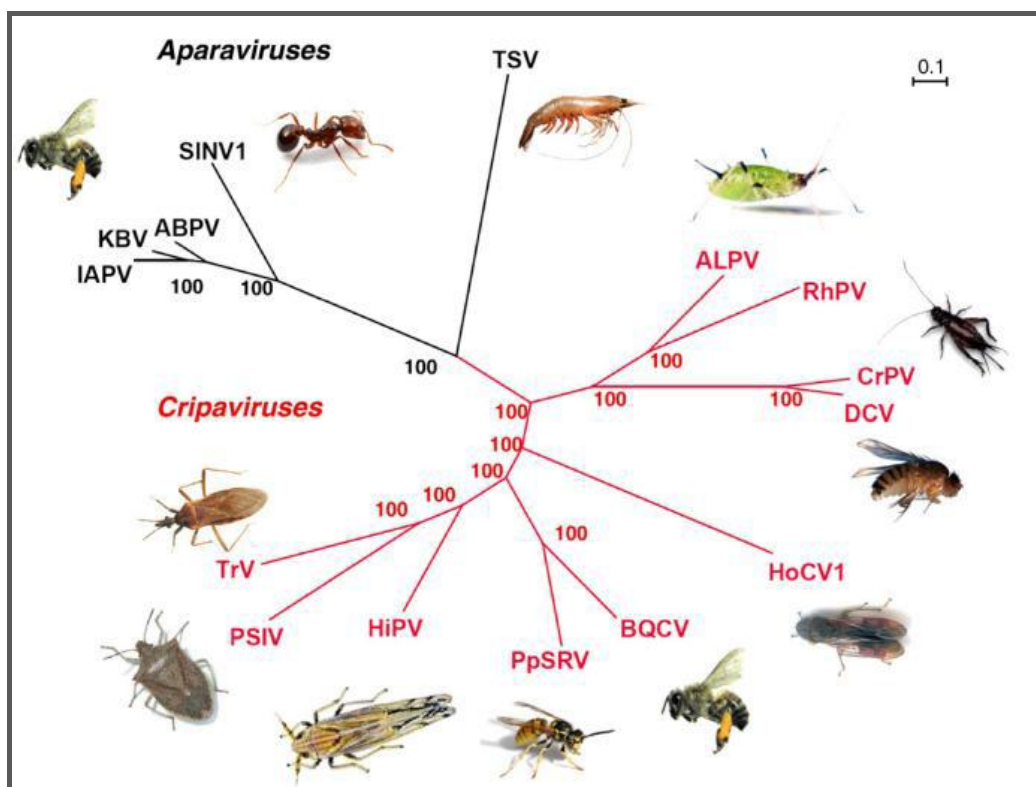


Figura 3a: Árbol filogenético de los *Dicistroviridae*. En rojo está indicado el género *Cripavirus*. En negro el género, aún pendiente de aprobación, *Aparavirus*. Para cada uno de los virus están indicados sus hospederos en la naturaleza. Fuente: Hertz y Thompson (2011).

De acuerdo a la bibliografía consultada, puede tomarse como modelo al virus de la parálisis del grillo (CrPV) que pertenece a la misma familia y género que TrV. El CrPV posee un amplio rango de huéspedes y replica fácilmente en distintas líneas celulares de insecto. Incluso este virus se ha adaptado muy fácilmente a crecer en cultivos en suspensión en gran escala, utilizando células de dípteros (DL2) (Scotti et al., 1996). Como señalan en sus resultados Christian y Scotti, el CrPV replica y causa efecto citopático en algunas líneas celulares derivadas de lepidópteros y dípteros (Moore et al., 1980). Generalmente la replicación viral coincidía con la aparición de efecto citopático (Masoumi et al., 2003). Masoumi describe además, la habilidad del CrPV para absorber y replicar en siete líneas celulares incubando células directamente con partículas virales purificadas y con transfección de ARN (Masoumi et al., 2003). El virus *Drosophila C virus* (DCV) replica fácilmente en muchas líneas

celulares obtenidas de *Drosophila*. Hasta el momento no se conocen otros Dicistrovirus que repliquen en líneas celulares (Boyapalle, 2007).

Hasta el momento no ha sido posible establecer un cultivo celular continuo derivado de áfidos, algunos cultivos sólo fueron viables por unos pocos días. Boyapalle en su trabajo evaluó nueve líneas celulares derivadas de lepidóptera, díptera y hemíptera para diagnosticar la susceptibilidad de infección de otro Dicistrovirus, el *Rhopalosiphum padi virus* (RhPV). De esas nueve líneas celulares utilizadas, solo dos (de hemíptera), fueron permisivas por transfección del ARN de RhPV con aparición de efecto citopático (Boyapalle et al., 2007).

Si bien, no se conocen líneas celulares susceptibles al TrV, se intentará su replicación en líneas de dípteros y lepidópteros. Se desconoce además, si el virus producirá efecto citopático (ECP) visible en las células.

### **3.2- MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.2.1- REPLICACIÓN DE TrV EN LÍNEAS CELULARES DE INSECTO**

##### **Proceso de transfección**

El proceso de transfección implica la introducción de un ADN/ARN exógeno a una célula eucariota. Para la transfección del ARN viral se emplearon células de la línea celular de dípteros, *Aedes albopictus* (clon C6/36) y líneas celulares de lepidópteros: *Spodoptera frugiperda* (SF9, SF21) y HighFive. Las células SF9, SF21 (*Spodoptera* ATCC) y HighFive se obtuvieron de la Cátedra de Virología, congeladas en nitrógeno líquido. Del Banco Argentino de células (ABAC) se obtuvo la línea clon C6/36 (larva de *Aedes albopictus* ATCC).

El RNA viral fue extraído de TrV purificado, por la metodología convencional de fenol/tiocianato de guanidina, ya expuesta anteriormente en el Capítulo 2 (Trizol – Invitrogen). Partiendo de 500 µl de virus purificado con el agregado de 500 µl de Trizol y 220 µl de cloroformo. La precipitación se realizó con 750 µl de isopropanol y 650 µl de la fase acuosa durante toda la noche a -70°C. Se lavó 3 veces el pellet con 200 µl de etanol. Luego, se resuspendió el ARN en 20 µl de agua libre de nucleasas y se determinó la

concentración obtenida midiendo absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro.

Las células, en todos los casos, fueron cultivadas en frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>3</sup> (Greiner Bio-One BioScience, USA) y 75 cm<sup>3</sup> (Greiner Bio-One BioScience, USA). Para evaluar la capacidad de infección de las células, cada línea celular fue sembrada en cuatro pocillos de una placa de 12 pocillos a una densidad distinta dependiendo del tipo celular y dejando pegar las células aproximadamente cuatro hs a TA. Las células SF9, SF21 y HighFive utilizan medio Grace y las células C6/36 crecen en medio esencial mínimo (MEM). En ambos casos se agrega 10% de SFB para crecimiento celular y 2% del mismo como medio de mantenimiento. Las células SF9 y SF21 fueron sembradas a una concentración de  $1,5 \times 10^5$  cel/ml; las células C6/36 a  $4 \times 10^5$  cel/ml y las HighFive al  $6 \times 10^4$  cel/ml. Las células no adheridas y el medio fue removido y reemplazado con medio libre de suero y un pocillo fue tratado con cada mezcla. Los tratamientos fueron incubados toda la noche a 28°C. Una concentración de células de  $2 \times 10^6$  cel/ml fue infectada con las distintas mezclas que fueron preparadas por triplicado, para las tres líneas celulares. De acuerdo a la bibliografía consultada, la transfección se realizó con lipofectina y entre 1 a 4 µg de ARN (Boyapalle et al., 2007; Masoumi et al., 2003).

- a) 2,5 µl RNA fresco + 100 µl TC100
- b) 5 µl RNA fresco + 100 µl TC100
- c) 40 µl lipofectina (Invitrogen) + 200 µl TC100

Todas las mezclas fueron incubadas a TA durante 45 min. Posteriormente, se mezclaron partes iguales de mezcla a + c y b + c y a cada tubo se agregó 800 µl de medio TC100. Luego se adicionó cada mezcla a cada pocillo con las monocapas de células durante 4 hs. Finalmente se agregó 1 ml de TC100 con 2% SFB a cada pocillo y se observó durante 7 días. Pasado ese tiempo se realizaron dos pasajes ciegos más en cada uno de los tipos celulares.

### Electroporación de ARN

La electroporación es la incorporación de ADN/ARN a una célula mediante corriente eléctrica. Es un significativo aumento de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular causado por un campo eléctrico aplicado externamente. Para realizar este método se partió de RNA purificado como fue descripto anteriormente. Partiendo de una concentración aproximada de 177 ng/  $\mu$ l de ARN, se utilizaron 10  $\mu$ l para cada ensayo. Se lavaron 2 veces en tubos falcon, 2 frascos de células SF9, HighFive y C6/36 con medio TC100. Luego cada tubo se resuspendió en 1 ml de medio y se cargaron las celdas de electroporación. Se adicionaron 10  $\mu$ l de RNA a un tubo de los tres tipos celulares y el otro tubo servirá de control. La electroporación se realizó en hielo, a 310 V con un solo pulso (2.8 miliseg, 750V/cm, 10 uf) (Fig. 3b). Se dejaron 10 min en hielo. Luego se sembraron las células en placas de 6 pocillos. A las 4 horas de incubación a 28° C, se sacó el medio y se reemplazó por medio fresco TC100 con 2% SFB y se observó durante 7 días. Pasado ese tiempo se realizaron dos pasajes ciegos más en cada uno de los tipos celulares.

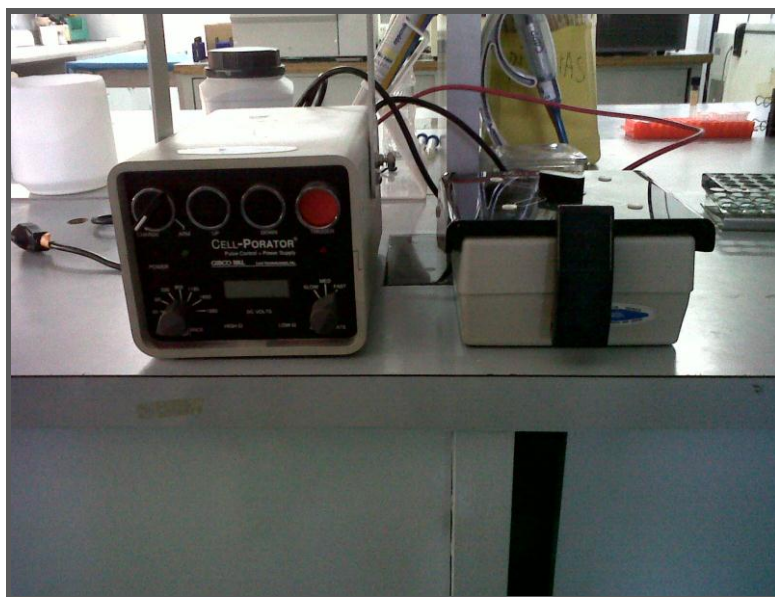


Figura 3b: Electropador Cell-Porator utilizado para este procedimiento.

**Inoculación con tripsina**

A fin de facilitar la entrada del TrV a las células de insecto, se utilizó un método clásico de Virología, que consiste en la incubación a temperatura permisiva de virus y tripsina en el momento de la adsorción viral y luego, la adición de una cantidad de tripsina en el medio de cultivo. Este fenómeno se utiliza de rutina en muchos virus desnudos para facilitar la penetración viral (Hoshino et al., 2005). Se preparó una solución concentrada de 10 ug/ml de tripsina en solución fisiológica (10X). Se prepararon pocillos de células SF9, HighFive y C6/36 y alcanzada la monocapa celular a las 24 hs, se inocularon con la siguiente mezcla:

10 µl de solución de tripsina (1X) + 1 ml de virus purificado filtrado por 0,22

Se inocularon los pocillos respectivos dejando controles sin inocular, y luego de 1 h de incubación a 28°C, sin extraer el inóculo, se adicionó el medio de cultivo respectivo suplementado con 0,5 ug/ml de la solución de tripsina. Las células fueron observadas diariamente para la evaluación de ECP. Se realizaron dos pasajes más en cada tipo celular con los sobrenadantes de infección.

**Inoculación directa: virus purificado**

También se realizó la inoculación directa del virus. Para ello se filtró una cantidad de virus purificado diluido en un volumen de PBS por 0,22 µm. Se procedió de la siguiente manera: un frasco con monocapa completa de SF9, HighFive y C6/36 de 25 cm<sup>3</sup> (Greiner Bio-One BioScience, USA) se sembró a una placa de 12 pocillos (Greiner Bio- One) y 24 horas después se prepararon las mezclas de inoculación:

- a) 10 µl de TrV purificado (aproximadamente 2,6mg/ml) + 90 µl de medio Grace
- b) 20 µl de TrV purificado + 80 µl de medio Grace

La Pre- mezcla de incubó 15 min a T° ambiente. Se cultivaron células SF9, Hi5 y C6/36 en una placa de 12 pocillos. Se removió el medio de cultivo y a cada uno se le agregaron las respectivas mezclas. Dos pocillos quedaron como

controles. La placa se incubó durante 1h a 27°C y cada 15 min se movió suavemente la placa. Se adicionó Suero Fetal Bovino (SFB) al 2%.

Luego de una incubación de 1 h a 27°C, el inóculo fue removido y reemplazado por 3 ml de medio TC con el agregado de 2% de SFB. Las células fueron incubadas a 27°C durante 72-96 hs. Se procedió a la visualización de las mismas todos los días subsiguientes. Se realizaron pasajes, hasta 5 en algunos casos: el sobrenadante y las células fueron removidas y centrifugadas a 10000 rpm durante 10 min. Fueron nuevamente infectadas las células como se detalló anteriormente. De la misma manera se realizó electroporación de partículas virales purificadas con la metodología ya descripta.

### **3.2.2-OBTENCIÓN DE CULTIVO PRIMARIO DE *T. INFESTANS* LIBRE DE TrV**

En el caso de la replicación en cultivo primario, es la primera vez que se cita, por lo menos para el caso de TrV. Se detalla a continuación la metodología utilizada en cada caso para huevos o ninfas.

#### **3.2.2.1- INSTALACIÓN Y MANTENIMIENTO DE COLONIAS DE *T. INFESTANS* EN EL LABORATORIO**

Para realizar el cultivo primario se utilizaron insectos de las colonias de *T. infestans* instaladas y mantenidas en el CEPAVE. Estas colonias fueron instaladas a partir de un pie de cría obtenido del Insectario del Servicio Nacional de Chagas localizado en Santa María del Valle de Punilla, provincia de Córdoba, en el año 2008.

El mantenimiento general del Insectario fue llevado a cabo con la misma metodología descripta en el capítulo 2 (Marti, 2005). Las colonias se mantuvieron en insectario semejantes a los utilizados en los insectos de campo. Tanto machos como hembras de *T. infestans* se colocaron en recipientes plásticos de 12 cm de diámetro y 12 cm de altura cubiertos por una tela de nylon. En el interior de los recipientes se colocaron papeles plegados en posición vertical para permitirles a los insectos ascender hasta el borde del recipiente en el momento de la alimentación además de protegerse de la luz del ambiente entre los pliegues del papel. Se colocaron en recipientes separados por estadios: cerca de 100 individuos para las ninfas I y II, aproximadamente 40 ninfas III, IV y V y un número inferior a 20 en los

recipientes con adultos manteniendo la relación de sexo 1:1. La alimentación de los insectos y los parámetros del insectario fueron los mismos que se utilizaron para los insectos recolectados en el campo.

El instrumental y los recipientes, tanto para el manejo de los insectos de la colonia como los recolectados en el campo, fueron mantenidos con lavados por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio 2,5% durante 15 min, luego con 5 min de alcohol 96°, para finalizar con 5 min en agua destilada estéril.

Cabe destacar que la única diferencia que existe con respecto a la colonia infectada con TrV, fue la no incorporación de ninfas periódicamente que si se le realiza a la colonia de TrV.

### **3.2.2.2- SUSTRATOS PARA LA REALIZACIÓN DE CULTIVO PRIMARIO: EMBRIONES Y ADULTOS**

#### Embriones

Para este sustrato se utilizaron distintas metodologías. Para todos los casos la temperatura de incubación fue de 28° C y se emplearon placas de plástico estéril. Todos los ensayos se observaron diariamente hasta verificar la formación de clones celulares. Se utilizó el método descrito por Bell-Sakyi y colaboradores (2007). Se alimentaron adultos de la colonia del insectario y se tomaron las hembras. Estas se lavaron 5 min en tiomersal y 20% de etanol. Luego 5 min en cloruro de benzalconio y 1 min en etanol 70%. Se realizaron dos lavados en agua estéril y se dejó secar. Se incubaron en placa de petri hasta su oviposición. Luego de 7-10 días de la oviposición, se lavaron los huevos durante 2 min con etanol 70% y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y una vez con medio de cultivo. Utilizando un mortero se obtuvieron las cáscaras de los huevos y se las sumergió con HLT. La solución fue filtrada con malla estéril (70 % etanol) y se retiraron cuidadosamente las cascaras.

#### ➤ Sin tripsina

En una cápsula de petri se colocaron los huevos con PBS para su hidratación y lavado. Se seleccionaron los huevos con un espejo con aumento, debido al tamaño de los mismos, y con una pinza previamente esterilizada se



transfirieron a otra cápsula. Se procedió a abrirlos cuidadosamente, con la ayuda de la lupa y la pinza y se retiró cuidadosamente el embrión. Se traspasó a un mortero con medio de cultivo Grace, congregando en pequeños grupos de 10, 15 y 20 embriones. Se procedió a disgregar las células cuidadosamente con pipeteo. Se sembró una placa de 12 pocillos y se rotuló debidamente. Con el mismo macerado se sembraron distintas cantidades en los pocillos: 100, 200, 400 y 500  $\mu$ l, a los que se agregaron cantidades suficientes de medio Grace con 10% SFB para permitir el crecimiento de las células (Fig. 3c).

➤ Con tripsina

En este método se procedió de manera similar a lo anterior, pero realizando la dispersión de las células en agitación con una solución de tripsina, durante 15 min. Luego, se procedió a centrifugar a 1500 rpm por 5 min, para luego resuspender en medio Grace con 10% SFB y sembrar en distintos volúmenes como fue indicado en el apartado anterior. En este caso se realizaron algunas modificaciones como ser, el filtrado por malla metálica estéril y la trituración con tijeras.

➤ Explantos

En este caso se colocaron en pocillos de placas la cantidad de 10, 15 o 20 embriones con medio de crecimiento, a fin de obtener explantos celulares.



Figura 3c: Preparación de los embriones de triatominos para realizar cultivo primario.

### Adultos

Para los puntos subsiguientes la metodología fue básicamente la misma. Los triatominos que se utilizaron fueron adultos, 5 hembras y 5 machos, privados de ingesta durante 20 días. Al momento de retirar gónadas (testículos y ovarios), buche e intestino, se colocaron en cápsulas de petri con PBS. Se cortaron los órganos y se mezclaron con la ayuda de una pipeta. Se colocó tripsina como agente dispersante: 1,5 o 3 ml dependiendo el tamaño. Se colocaron perlas de vidrio e imán en un enlarmeyer y se colocó en agitación 20 min. Se centrifugó y se descarto la tripsina. Se procedió a sembrar, colocando previamente medio de cultivo con 10% SFB y por último 20  $\mu$ l de antibiótico (ATB, Penicilina).

### 3.2.3- INOCULACIÓN DE HUEVOS EMBRIONADOS DE AVES

La técnica de inoculación en huevos embrionados es utilizada para el aislamiento de varios virus, entre ellos el virus influenza. Para ser inoculados debe reunir ciertas condiciones, como ser la edad (tiempo de incubación) para que el embrión, las cavidades extraembrionarias y membranas adquieran el tamaño necesario de acuerdo con la vía de inoculación elegida, y además provenir de animales con buenas condiciones sanitarias. El éxito de la infección puede manifestarse como muerte del embrión, alteraciones macro y microscópicas, cuerpos de inclusión, hemorragias, retraso en el crecimiento, etc.

No hay antecedentes sobre el tema para el caso de TrV. Por lo cual se tomo al virus de la aftosa como ejemplo para realizar la técnica, ya que en un principio TrV estuvo ubicado taxonómicamente dentro de los *Picornaviridae* (la misma familia a la que pertenece el virus aftosa).

Se seleccionó la cavidad alantaoidea para realizar la inoculación del virus. Se inocularon 0,2 ml del virus purificado a nueve huevos y 0,2 ml de PBS estéril a otros tres huevos, utilizados como control negativo. Con esmalte se selló el punto de inoculación y la cámara de aire. Se lo dejó incubar a 3 temperaturas: 28, 32 y 37° C cada grupo (3 más 1 control) durante 96 hs. Luego, se cosechó el líquido alantoideo, y se traspasó a un tubo falcon para centrifugarlo. Se realizó la técnica de hemaglutinación (HA) para verificar la presencia y título del virus.

### 3.2.4- TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN

Para todos los métodos y ensayos descriptos en este apartado, se utilizaron técnicas de SDS-PAGE, Western Blot (WB), Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y RT-PCR para confirmar la presencia del TrV en las células. Para evaluar el líquido alantoideo se utilizó la técnica de hemaglutinación (HA).

### SDS-PAGE

Las células fueron removidas y centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue recolectado y el pellet fue lavado en PBS (PBS: 50nM Fosfato de Potasio; 150 nM NaCl; pH 7.2) para eliminar los restos de medio y

resuspendido en 200 a 300  $\mu$ l del mismo buffer. Luego 30  $\mu$ l de muestra fueron combinados con partes iguales de 2X buffer de muestra para SDS-PAGE. Posteriormente las muestras fueron sometidas a 90°C en bloque térmico durante 5 min. Para la técnica de SDS-PAGE fue utilizada la cuba Bio-Rad Mini- PROTEAN Tetra Cell (Bio- Rad, USA). Los geles de poliacrilamida fueron preparados al 12,5%. El gel de siembra fue preparado al 5%. Se sembraron 20  $\mu$ l de muestra y se utilizó el marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas). La separación de las proteínas se logró mediante una corrida electroforética, para dos minigeles, a 80 V durante 4 horas, utilizando buffer Tris glicina 1X. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie al 0,1% y desteñidos con una solución decolorante en agitación durante 12 h.

#### **WESTERN BLOT (WB)**

La técnica de Western Blot consiste en la transferencia de las muestras proteicas separadas electroforéticamente en gel a una membrana soporte en donde se realiza la inmunodetección de estas proteínas con anticuerpos específicos hacia las mismas. Para realizar la transferencia de proteínas se realizaron geles de SDS-PAGE como fue explicado en el punto anterior sin teñir en Coomassie. Luego de la corrida electroforética, se equilibró el gel en buffer de transferencia, a fin de facilitar la remoción de sales y detergentes del buffer de corrida. Se cortaron membranas de nitrocelulosa (Sigma) de 0,45  $\mu$ m y papel de filtro del tamaño del gel las que también fueron humedecidas en buffer de transferencia para asegurar la correcta adhesión de las moléculas al soporte. Se armó el “sándwich” de transferencia evitando la formación de burbujas entre los distintos componentes. La electrotransferencia se realizó en sistema semiseco (BioRad) a 15 V durante 30 min. Finalizado el tiempo de transferencia se retiró la membrana y se incubó toda la noche a 4 °C en solución de leche descremada para bloquear los sitios libres de la membrana donde no hubiera proteína unida. Luego del bloqueo, la membrana fue lavada 3 veces durante 5 min con PBS-Tween 20 0,1% para eliminar los restos de solución de bloqueo. Para la detección de las proteínas, se utilizaron el anticuerpo primario (suero de conejo anti-TrV diluido 1/40) y secundario (anti-conejo conjugado con peroxidasa diluido 1/400 Sigma) (Marti et al.,

2008). La membrana se incubó entre 1-3 horas a TA con cada uno de los anticuerpos. Entre cada una de las incubaciones se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS-Tween 20 0,1%. Para el revelado de la reacción se empleó Diaminobenzidina (DAB) (Sigma) y agua oxigenada como sustrato de la enzima peroxidasa. En algunos revelados se reemplazo la DAB por 3,3', 3,5' tetrametilbenzidina (TMB) (Promega).

Las soluciones utilizadas en la técnica de Western Blot se detallan a continuación:

- a) Solución de Bloqueo: 5% de leche en polvo (Gibco) en PBS-Tween 20 0,1%.
- b) Solución diluyente: 3% de leche en polvo (Gibco) en PBS-Tween 20 0,1%.
- c) Solución de lavado: PBS Tween 20 0,1%.
- d) Solución de revelado: 30mg de DAB y disolver en 100ml de PBS. Agregar 30 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 Vol como catalizador. Frenar la reacción de revelado con agua corriente.

#### **Técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

La técnica de inmunofluorescencia indirecta es ampliamente usada en el diagnóstico virológico debido a su alta especificidad. Es muy útil para el diagnóstico e identificación de un virus que fue aislado como así también para diagnóstico. Esta técnica requiere de anticuerpos (Ac) purificados, un Ac primario y uno conjugado con fluoresceína (fluorocromo con la propiedad de excitarse con los rayos UV y emitir, de esa manera, una luz verde brillante) o Ac secundario anti-especie. Estos generalmente son comerciales.

La técnica consiste básicamente en colocar las células infectadas con el virus, en un portaobjetos o celdas de cultivo estériles (BD Falcon). Monocapas confluentes de células SF9, HighFive y C6/36 crecidas en cámaras de cultivo, se inocularon con los sobrenadantes de las experiencias anteriores, aproximadamente 100 µl (cuartos o quintos pasajes de transfección, electroporación o virus purificados). Los portaobjetos se incubaron a 27°C durante 1 hs y luego se agregó medio TC100 con 2% SFB (200 ul). Luego de 72 hs, se recolectó el sobrenadante y las células se fijaron con acetona a -20°C durante toda la noche. Los portaobjetos se lavaron tres veces con solución

fisiológica y se los incubó a 37°C durante 45 min con el suero primario de conejo anti-TrV en distintas diluciones (1/20, 1/40, 1/80). Luego de 3 lavados suaves con SF, se adicionó el suero secundario anti-conejo conjugado con ITCF diluido en SF 1/100 (parte superior) y 1/200 (parte inferior de la cámara) a 37°C durante 45 min en cámara húmeda. Finalmente, se realizaron tres lavados de cinco min con solución fisiológica. Si existió unión Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac), el Ac quedará unido y no será arrastrado. Luego se dejó suavemente secar y se procedió al montaje (50% glicerina + 50% de SF). La visualización de las células infectadas se realizó en un microscopio de epifluorescencia Olympus System microscope Model BHS: si las células estuviesen infectadas con el virus se visualizará una reacción verde brillante característica.

### **Detección directa por RT-PCR**

Para la verificación de infección en este caso se modificaron los moldes, del resultado del cultivo de células, ya sea pellet o sobrenadante. La extracción de ARN se realizó con 50 µl de pellet y 300 µl de sobrenadante de acuerdo al método indicado en el Capítulo 2.

### **Microscopio electrónico de transmisión (MET)**

El uso de la microscopía electrónica ha permitido importantes avances en el estudio de las estructuras celulares. Los microscopios electrónicos modernos poseen una resolución del orden de los 0,2 nm. El microscopio electrónico de barrido (MEB) revela detalles tanto de superficie como intracelular; en el microscopio electrónico de transmisión (MET), un haz homogéneo de electrones pasa dentro de una columna con alto vacío, a alta velocidad, a través de una muestra lo suficientemente delgada como para transmitir no menos del 50% de los electrones que inciden sobre ella. El microscopio utilizado en este trabajo es de transmisión, como fue indicado en el Capítulo 2.

#### Técnica para células

Para la técnica de microscopía electrónica, células supuestamente infectadas con el virus fueron lavadas tres veces con PBS estéril y

centrifugadas a 1000 rpm durante 10 min y fijadas en glutaraldehído. Luego, el material se seccionó en un ultramicrotomo LKB Ultratome III automático, con un espesor de 100 nm, colocándolos en grillas. Los cortes fueron contrastados en una gota de acetato de uranilo acuoso durante cinco min. Se lavaron tres veces en agua desionizada e inmediatamente se sumergieron en una gota de citrato de plomo durante cinco min. Las grillas se lavaron con agua desionizada 3 veces y se dejaron secar al aire antes de ser observadas.

#### Tinción negativa

Una gota de sobrenadante supuestamente infectado con el virus fue colocada en una grilla con membrana de colodión y se la dejó absorber durante 7 min, retirando el excedente. A continuación, una gota de ácido fosfotungstico fue colocada sobre la grilla e incubada durante 40 seg. Finalmente, la grilla fue secada unos min y observada en el microscopio electrónico.

#### **Técnica de hemaglutinación (HA)**

El principio de esta técnica consiste en demostrar la presencia de hemaglutininas virales. Este fenómeno ocurre en el líquido sobrenadante del cultivo. Este líquido (rico en virus), se enfrenta con una suspensión de glóbulos rojos. Si la reacción es positiva, los glóbulos rojos forman una malla fina, que se deposita lentamente en el fondo del tubo y se visualiza como un halo grande. Por el contrario, si es negativa, decantan al fondo del tubo formando un botón. El uso de esta técnica sólo permite arribar a un diagnóstico presuntivo. En este caso, se escogió un vial de virus purificado y una solución de glóbulos rojos de pollo. Asimismo se evaluaron los líquidos alantoideos cosechados y los sobrenadantes de infección. Se extrajeron 5 ml de sangre de pollo en solución de Alsevers (0,055% de Ac. Cítrico; 0,8% de Citrato de sodio; 2,05% de Glucosa; 0,42% de Cloruro de sodio y agua tridestilada). Se centrifugó la mezcla eliminando el plasma sanguíneo, y utilizando únicamente los glóbulos rojos, para ello se centrifugó a 2000 rpm durante cinco min. Se repitió el procedimiento tres veces utilizando el paquete de glóbulos rojos y PBS. Se descartó el sobrenadante y se colocó nuevamente PBS, mezclando suavemente (250 µl de paquete globular en 50 ml de PBS -

0,5%-). Se cargó la placa de 96 pocillos (fondo “V”), con 50 µl de PBS desde la segunda columna y se colocó en la primera, 100 µl del virus purificado o líquido alantoideo o sobrenadante de infección. Con pipeta multicanal se realizaron diluciones base 2 hasta la columna 11. La columna 12 contiene sólo 50 µl de PBS. Por último se agregaron 50 µl de la solución de glóbulos rojos lavados y se dejó a TA 1 h en incubación para su lectura.

### **3.3- RESULTADOS**

#### **3.3.1- REPLICACIÓN DE TrV EN CÉLULAS DE INSECTO Y CULTIVO PRIMARIO**

La inoculación del TrV en cultivos celulares de insecto, ya sea como partículas purificadas completas como con ARN purificado evidenció en algunos casos probables signos de infección o ECP visible en las primeras 24-48 hs. Luego de los sucesivos pasajes, este efecto desaparecía. Estos experimentos fueron realizados en 3 oportunidades en el caso de la electroporación de ARN y en dos oportunidades mediante adición de lipofectina; 2 en el caso de inoculación directa de virus purificado y 2 por electroporación de partículas virales (Fig. 3d).



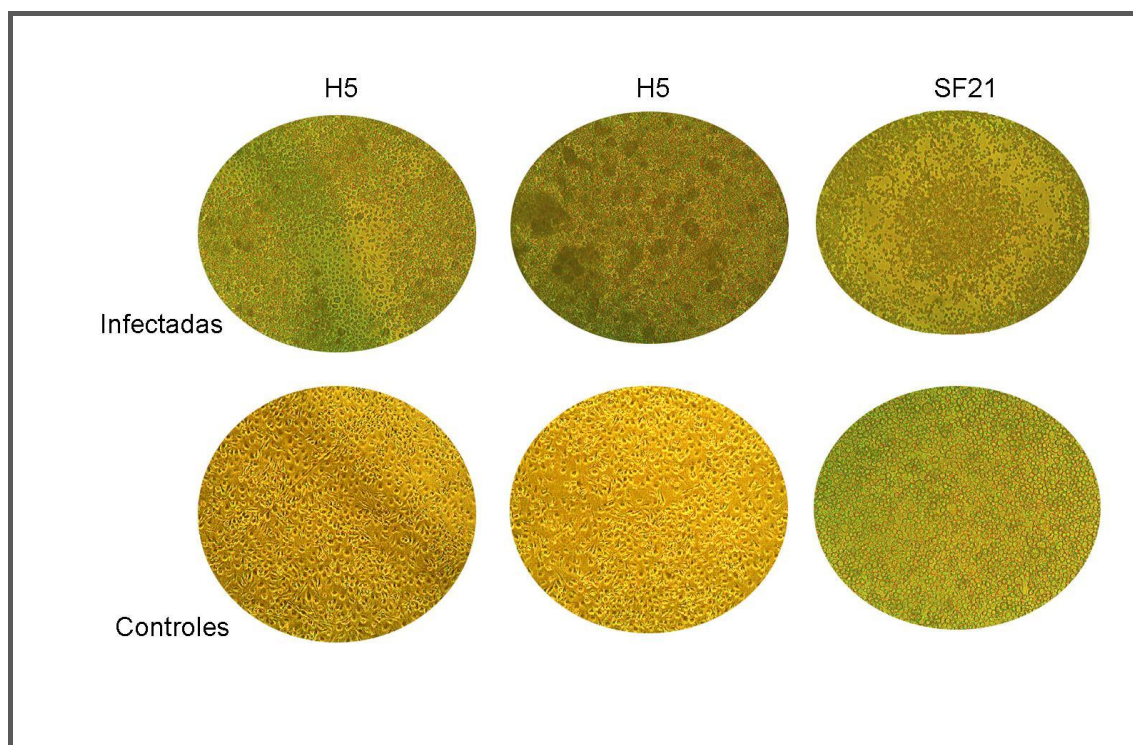


Figura 3d: A la izquierda, células H5 infectadas con TrV (con lipofectina). En el centro células H5 infectadas con TrV. A la derecha células SF21 infectadas con TrV (con lipofectina). Debajo de cada una su control de células correspondiente.

No fue posible obtener un clon celular a partir del ensayo partiendo de tejidos adultos o embrionarios de vinchucas sanas. A pesar de decontaminar las superficies tanto de adultos como de embriones, los mismos se contaminaron antes que pudieran anclarse las células al soporte. En algunos casos, los pocillos no se contaminaron en forma inmediata, pero al cabo de 5-6 días, si lo hicieron.

### 3.3.2- INOCULACIÓN DE HUEVOS EMBRIONADOS

En cuanto a la presencia de virus en líquido alantoideo por HA, en ningún caso obtuvimos resultado positivo, ni tampoco utilizando sobrenadantes supuestamente infectados (Fig. 3e). Sin embargo el virus TrV purificado utilizado como control, aglutinó los glóbulos rojos de pollo (Fig. 3e, abajo).

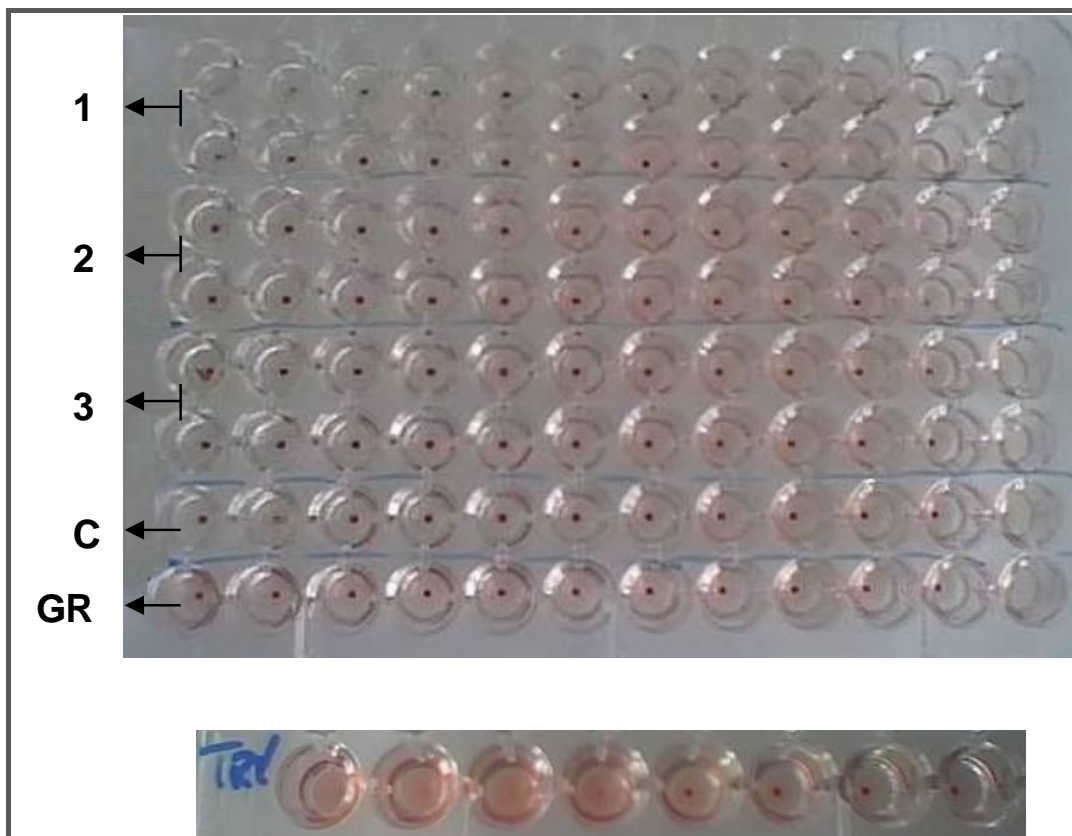


Figura 3e: Figura representativa de la técnica HA. 1: Líquido alantoideo A; 2: líquido alantoideo B; 3: sobrenadante de infección H5 (lipofectina). C: control líquido alantoideo sin infectar. GR: solución de glóbulos rojos lavados. En la figura de abajo: técnica HA mostrando a TrV (virus purificado) aglutinando glóbulos rojos.

### 3.3.3-TÉCNICAS DE CONFIRMACIÓN

En las pruebas complementarias de SDS-PAGE, WB, IFI, RT-PCR y ME no se obtuvieron resultados satisfactorios. A continuación se detallan individualmente cada una.

Para la técnica de SDS-PAGE se pudo evidenciar un resultado positivo luego de los primeros pasajes, mostrando con el pasar de los días un resultado negativo. En la figura pueden visualizarse las proteínas del virus (Fig. 3f).

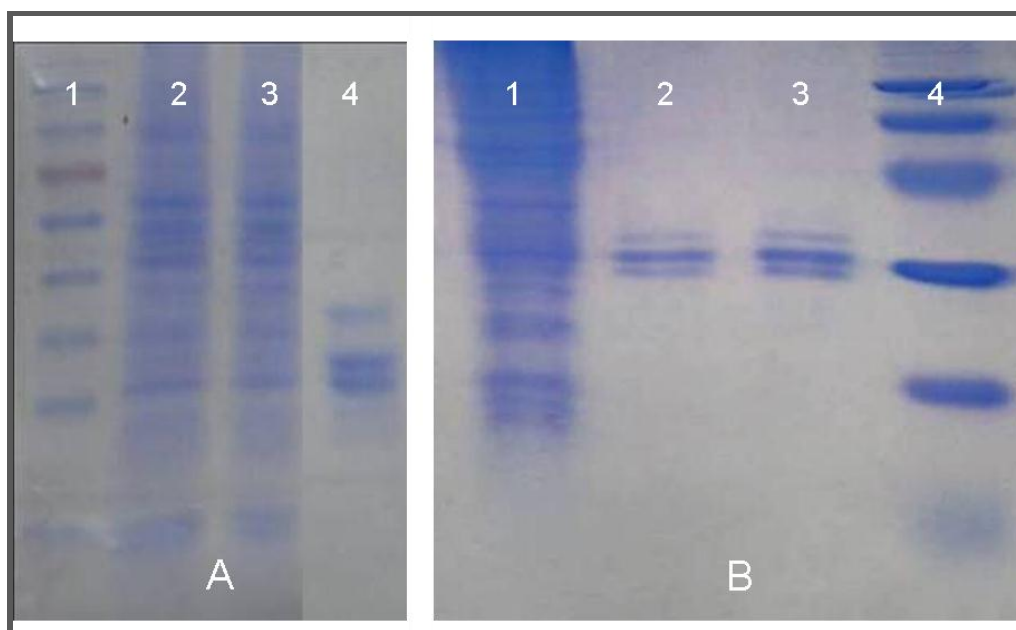


Figura 3f: A. Calle 1: Page Ruler Prestained Protein Ladder. Calle 2: Células SF9 sin infectar. Calle 3: Células SF9 infectadas. Calle 4: Control TrV B. Calle 1: Células H5 infectadas. Calle 2 y 3: Control TrV. Calle 4: Marcador Low Biorad.

En cuanto a la técnica de W. BLOTT solo se evidenciaron resultados positivos luego del primer pasaje de células, como en el caso anterior (Fig. 3g).

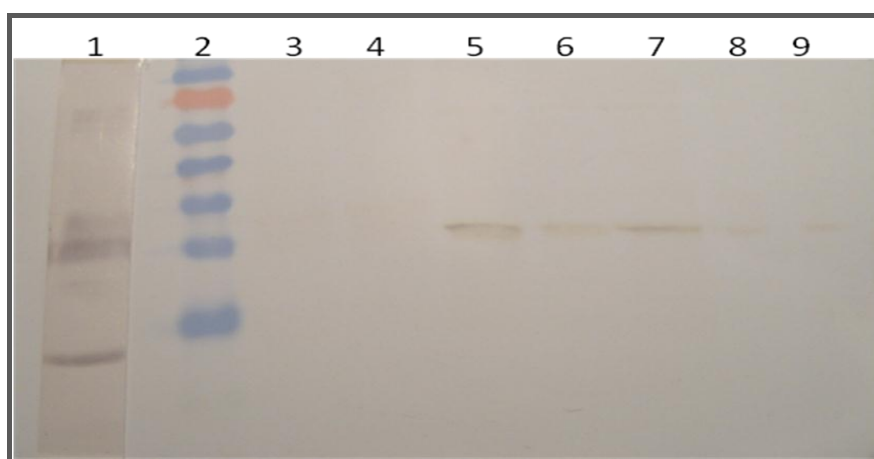


Figura 3g: Calle 1: Control de virus. Calle 2: Page Ruler Prestained Protein Ladder. Calle 3: SF9 (lipofectina). Calle 4: H5 (lipofectina). Calle 5: C6/36 (electroporación). Calle 6: SF9 (electroporación). Calles 7, 8 y 9: control de células SF9, H5 y C6/36 respectivamente.

La técnica de Inmunofluorescencia Indirecta realizada en células H5 infectadas con TrV mostró una fluorescencia inespecífica ya que en el control pueden evidenciarse las células con el color verde fluorescente característico (Fig. 3h).

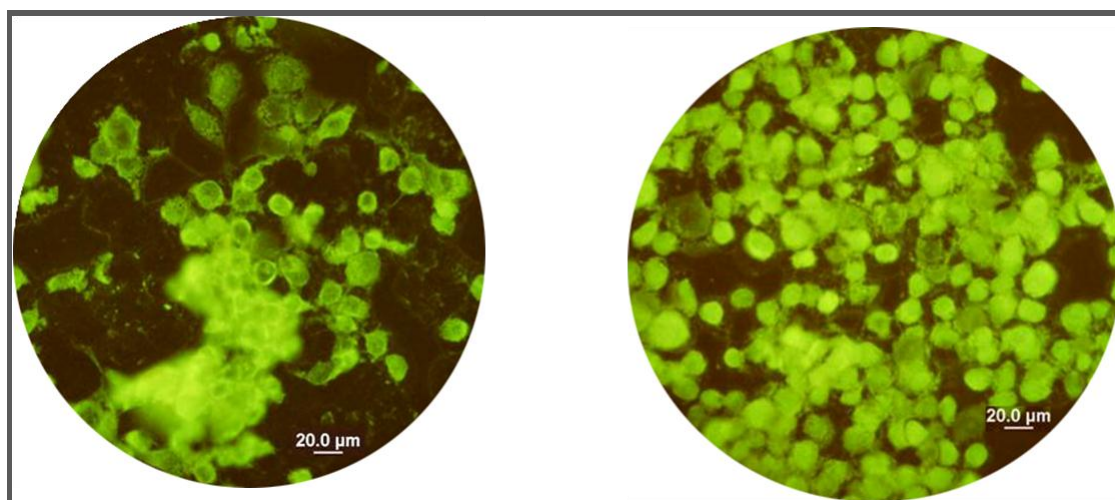


Figura 3h: Células HighFive infectadas (método lipofectina); al lado control de células.

La RT-PCR muestra resultados positivos solo luego del primer pasaje de células, como ocurre con el resto de las técnicas confirmatorias (Fig. 3i).



Figura 3i: L: marcador de peso molecular (100 bp). Calles 1-3 electroporación: 1:C6/36; 2:H5; 3:SF9. Calles 4-6 lipofectina: 4:C6/36; 5:H5; 6:SF9. Calles 7-9 controles de células: 7:C6/36; 8:H5; 9:FF9. Calle 10: control positivo. Calle 11: control negativo del virus.

En cuanto a la Microscopia Electrónica no se han observado resultados positivos como se muestra en la siguiente figura, resultado de la electroporación de las partículas completas del virus. Se optó por mostrar en la figura las células HighFive ya que es en estas células donde puede evidenciarse mucho más el posible efecto citopático evidenciado éste, por un cambio en la morfología de las células (Fig. 3j).

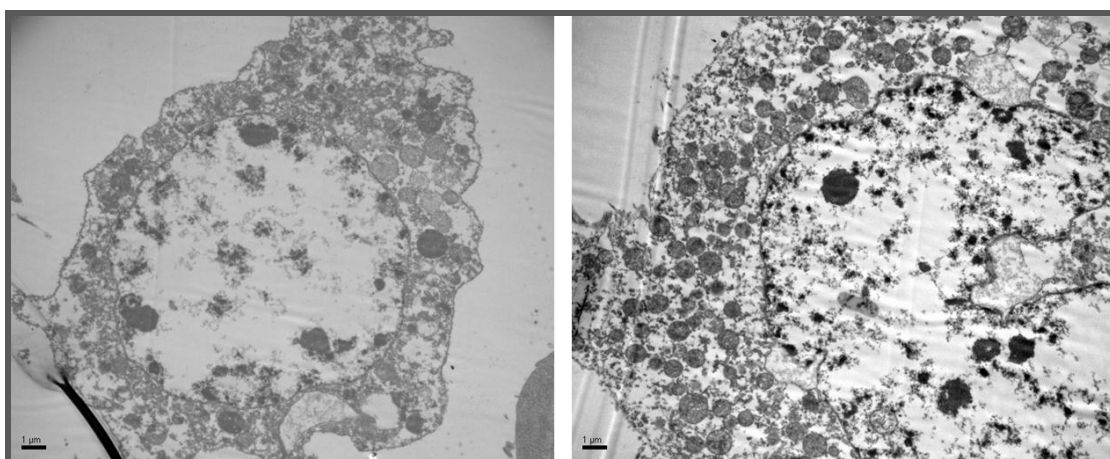


Figura 3j: Células H5 control y supuestamente infectadas con TrV (10000X).

### 3.4. DISCUSIÓN

La metodología utilizada en nuestro trabajo ha sido similar a la realizada por los autores anteriormente mencionados, tanto a nivel de la transfección del ARN como de infección directa de partículas virales purificadas. En nuestro caso no hemos tenido resultados satisfactorios. Las pruebas para determinar la presencia del virus como WB o RT-PCR también fueron similares en cuanto a su procedimiento a los autores expuestos. Sin embargo y como se observa en la figura 3g, el WB arrojó un resultado positivo luego del primer pasaje en células. Al igual que lo ocurrido en la RT-PCR. Luego de realizar sucesivos pasajes en las líneas celulares, tanto WB como RT-PCR resultaron negativos.

Masoumi y colaboradores tuvieron excelentes resultados tanto inoculando viriones purificados de CrVP como transfectando su ARN en otras líneas celulares: DL2 (díptera), *Anticarsia gemmatalis* y *Plutella xylostella* (lepidóptera) aunque no todas ellas mostraron ECP: solo en la línea DL2 se observó un marcado ECP tanto infectando con partículas como utilizando la transfección de ARN.

En el caso de líneas celulares de insectos, Christian y Scotti mostraron la habilidad del CrPV de replicar y mostrar ECP en líneas derivadas de lepidóptera y díptera. Este virus replica muy bien principalmente en *Anticarsia gemmatalis*, *Trichoplusia ni* y *Spodoptera ornithogalli* (líneas de lepidópteros) y *Drosophila* line 2 (línea de díptera) pero mostró insuficiente replicación en *Helicoverpa zea* (lepidóptera) y *Aedes albopictus* (díptera). Estos autores mostraron que la replicación coincide generalmente con la presencia de ECP en las células infectadas, pero en el caso de *Cydia pomonella* (lepidóptera) hay una considerable replicación en ausencia de ECP detectable y por el contrario en *Pieris rapae* (lepidóptera) se observa ECP en ausencia de replicación viral (Christian y Scotti 1996; 1998).

En vistas de las diferencias en la capacidad de las disímiles células de insectos en permitir la replicación viral, Massoumi y colaboradores, postularon la hipótesis de que la permisibilidad de la línea celular al CrPV no está exclusivamente determinada por la funcionalidad de sus IRES y evalúan la habilidad del CrPV de replicar y producir ECP en líneas celulares como indicador de tropismo viral. Demuestran que finalmente la funcionalidad de



los IRES no garantiza la permisividad de la línea celular. El IRES intacto es un pre-requisito para otras funciones virales pero no es suficiente en sí mismo para asegurar la replicación viral. Existen factores celulares y/o virales que se necesitan en conjunto para procesar y empaquetar los viriones maduros (Massoumi et al., 2003).

Boyapalle y colaboradores, identificaron una línea celular de hemíptera que permitía la replicación del RHPV, un virus que hasta ese momento no había sido posible replicar en líneas celulares. Lo contrario de lo hallado por Masoumi y colaboradores (2003) quienes encontraron tres tipos celulares susceptibles al CRVP. Esto demuestra que a pesar de que los virus pertenecen a la misma familia, las células responden diferente a la infección viral. Inclusive el ECP podría presentarse en los primeros cuatro o hasta diez días postinfección de acuerdo al tipo celular (Boyapalle et al., 2007). Otro detalle a tener en cuenta es que CRPV y DCV dan ECP en la mitad del tiempo que lo hace RHPV, que a su vez da menos ECP utilizando el doble de inóculo. Por WB se observó que el ARN transfectado fue traducido y que la poliproteína del ORF2 fue eficientemente procesada en las proteínas estructurales. Esto demuestra que los dos IRES son activos en estas líneas celulares de hemíptera (Boyapalle et al., 2007).

Las partículas virales purificadas de las células infectadas fueron indistinguibles morfológicamente del virus purificado obtenido de los áfidos (RhPV). Esto quiere decir que los factores celulares que se necesitan para procesar el genoma viral y ensamblar partículas están presentes en esas líneas celulares, por lo tanto se produjeron partículas infecciosas completas (Boyapalle et al., 2007).

Muchos virus ARN son comunes en poblaciones de insecto, y se sabe que producen epizootias, pero han recibido poca atención para usarlos como biopesticidas. Esto podría deberse a la dificultad de su producción, ya sea *in vivo* por la carencia de un producto puro, o bien por la ausencia de líneas celulares que permitan su replicación. Por el contrario la producción de baculovirus en gran escala como sistema de expresión de proteínas y para su uso como biopesticidas puede ser una herramienta muy atractiva (Pal et al., 2007).

Otra alternativa posible, sería la producción de cDNA completo y su

transcripción a RNA para ser usado en otros ensayos de transfección. Este método logró ser exitoso en el caso de RhPV en línea celular de hemíptera GWSS-Z10 (Boyapalle et al., 2008).

En el caso puntual del intento de cultivo primario de embriones o ninfas del primer estadio de triatominos obtuvimos resultados negativos. La literatura describe resultados exitosos utilizando células embrionarias para producir cultivos primarios que luego se transforman en líneas celulares como el caso de distintos dípteros e himenópteros (Echalier y Ohanessian, 1970; Schneider, 1972; Masakazu et al., 1980; Eide, 1975; Sohi y Ennis 1981; Lynn y Hung, 1986; Wahrman y Zhu, 1993).

Para el caso de áfidos, establecer un cultivo celular será muy importante para estudiar los virus que las afectan. Se han logrado cultivos *in vitro* de *Apis mellifera* a partir de células embrionarias durante tres meses de cultivo (Bergem et al., 2006), y fueron susceptibles otros cultivos con medios especiales al virus deformantes de las alas (DWV) (Hunter, 2010). Otros autores reportan la propagación del CrPV en líneas celulares de lepidópteros y dípteros en suspensión (Scotti et al., 1996).

Por otro lado, el intento de replicación del TrV por inoculación en huevos embrionados, específicamente en cavidad alantoidea, arrojó resultados negativos a pesar de que el TrV purificado utilizado como inóculo demostró aglutinación de glóbulos rojos a bajas diluciones. No existen en la literatura consultada citas que se refieran a este punto, sin embargo, la técnica de HA podría ser utilizada como método de titulación, al menos, de partículas virales purificadas de materia fecal de triatominos.

Comúnmente, al observar al microscopio electrónico el sobrenadante de células supuestamente infectadas, estas pueden visualizarse claramente. No fue posible en nuestro caso. Quizás esto se debió a que durante el proceso de preparación de las mismas, en la centrifugación de las células, estas se rompieron por lo cual no se pudo observar el material. Los casos de contaminación son comunes a la hora de trabajar en cultivo de células, por lo cual, este punto no habría que descartarlo. Además fueron muchos los inconvenientes que se nos presentaron debido a las fallas electrónicas del servicio de microscopía de la Universidad.



## **CAPÍTULO IV**

### **CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS**

#### **4.1- CONCLUSIONES FINALES**

- ❖ TrV no es específico de *T. infestans* ya que se ha encontrado en varias especies más.
- ❖ TrV se halla en el ambiente silvestre, además de domicilio y peridomicilio.
- ❖ De las muestras positivas analizadas por RT-PCR, 15 llegaron a secuenciarse. Además de la cepa del insectario del CEPAVE (TIN1).
- ❖ El análisis de las muestras secuenciadas no muestra variabilidad genómica significativa. Esto se ve reflejado tanto a nivel específico como así también respecto a su distribución geográfica y ambiente.
- ❖ No fue posible la replicación *in vitro* de TrV en líneas celulares de dípteros (C6/36) y lepidópteros (SF9, SF21, HighFive).
- ❖ Tampoco fue posible obtener un clon celular partiendo de tejidos adultos o embrionarios de vinchucas sanas.

## 4.2- PERSPECTIVAS

Actualmente mediante un convenio de cooperación (“Red Iberoamericana para el Estudio del Control Biológico con Triatoma virus de Triatomínos Transmisores de Chagas”, CYTED), con la participación de trece países de Latinoamérica y tres de Europa (Francia, España y Portugal) se está trabajando en diferentes líneas de investigación como análisis de insectarios, prevalencia a campo de TrV, competencia con *T. cruzi*, transmisión horizontal y vertical de TrV y su respuesta inmune, entre otras.

Se prevé en un futuro inmediato, profundizar los estudios de TrV en Argentina, con el objetivo final de determinar un potencial uso del virus como agente de control biológico en triatomínos transmisores de la Enfermedad de Chagas. Para llevar a cabo este objetivo se evaluarán los siguientes puntos que se detallan a continuación:

- ❑ Investigar la presencia de anticuerpos anti-TrV en humanos y perros de zonas positivas a TrV, positivas a *T. cruzi*, zonas libres a TrV y zonas libres a *T. cruzi*.
- ❑ Obtener un sistema para la replicación de TrV *in vitro*, empleando líneas celulares de hemípteros. Para esto se solicitaron a investigadores de Estados Unidos líneas celulares de hemiptera: *Agallia constricta* (AC-20); *Homalodisca coagulata* (GWSS-Z10) y *Dalbulus maidis* (DMII-AM) (Dra. Cinthia Goodman y Dr. Geoge Kamita).
- ❑ Poner a punto una técnica molecular para la detección simultánea de TrV y *T. cruzi*.
- ❑ Continuar analizando regiones genómicas de los distintos aislamientos de TrV y analizar mediante programas informáticos, si se encuentran diferencias entre TrV provenientes de diferentes triatomínos.

TrV aún no ha sido evaluado como agente de control de vectores de la Tripanosomiasis americana. Gran parte de los hallazgos fueron naturales,

siendo la mayoría de las citas referidas a ensayos experimentales, contaminantes o presencias accidentales. Aunque los efectos negativos en triatomíneos se conocen, la falta de información suele abarcar aspectos básicos de la biología y ecología de campo de los mismos.

El manejo integrado constituye la gran promesa para el control de vectores de enfermedades tropicales, incluyendo la aplicación de insecticidas sintéticos, la modificación del ambiente y la utilización de enemigos naturales. En este contexto, resulta necesario adquirir un profundo conocimiento de la ecología del vector junto a una participación comunitaria en los programas de vigilancia y control, a fin de hallar la solución para eliminar la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas.

Este estudio constituye un importante avance en el conocimiento de TrV, como único virus entomopatógeno de triatomíneos transmisores del Chagas. Una enfermedad que a más de 100 años de las primeras publicaciones científicas sigue siendo un problema serio en salud pública no solo en nuestro país sino en toda Latinoamérica, cuya solución definitiva es aún un desafío y que a nuestro juicio requiere ser profundizado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ◆ Abad-Franch F, Noireau F, Paucar A, Aguilar M, Carpio C y Racines J, 2000. The use of live bait traps for the study of sylvatic *Rhodnius* populations (Hemiptera: Reduviidae) in palm trees. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94: 629-630.
- ◆ Adams JR y Bonami JR. 1991. Atlas of invertebrate viruses. CRC Press, Boca raton, FL, USA, pp 684.
- ◆ Agirre J. 2009. Structural basis of the stability, infectivity and (dis)assembly process of Triatoma Virus (TrV). Tesis doctoral, Universidad del País Vasco, Leioa, pp. 148.
- ◆ Agirre J, Aloria K, Arizmendi JM, Iloro I, Elortza F, Sánchez-Eugenia R, Marti G A, Neumann E, Rey FA y Guerin DMA. 2011. *Virology* 409: 91-101.
- ◆ Azambuja P y Garcia ES. 1997. Care and maintenance of triatomine colonies. En *Molecular biology of insect disease vectors: a methods manual*. Crampton JM, Beard CB, Louis C (eds). Chapman and Hall, London, pp. 56-64.
- ◆ Bacigalupo BA, Segura MJA, García CA, Hidalgo CJ, Galuppo GS y Cattán PE. 2006. Primer hallazgo de vectores de la enfermedad de Chagas asociados a matorrales silvestres en la Región Metropolitana, Chile. *Revista Médica de Chile* 134 (10): 1230-1236.
- ◆ Barrett TV. 1976. Parasites and predators of triatominae. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 318: 24-30.
- ◆ Baruch WA, Arribada JA, Bulla DH, Carlier Y, Rodrigues J y Chuit R. 2005. Consulta Técnica Regional OPS/MSF sobre Organização e estrutura da atenção médica do doente e infectado por *Trypanosoma cruzi*/doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical* 38: 538-41.

- ◆ Becnel JJ. 1997. Complementary techniques: Preparations of entomopathogens and diseased specimens for more detailed study using microscopy. En *Manual of techniques in insect pathology*. Lacey LA (ed). Academic Press, San Diego, USA, Capítulo VIII-1, pp. 337-353.
  
- ◆ Bell-Sakyi L, Zweygarth E, Blouin EF, Gould EA y Jongejan F. 2007. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends in Parasitology* 23 (9): 450-457.
  
- ◆ Bergem M, Norberg K y Aamodt RM. 2006. Long-term maintenance of in vitro cultured honeybee (*Apis mellifera*) embryonic cells. *BMC Developmental Biology* 6:17-27.
  
- ◆ Blanchard P, Schurr F, Celle O, Cougoule N, Drajnudel P, Thiery R, Faucon J y Ribiere M. 2008. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 348-350.
  
- ◆ BLASTN. National Center for Biotechnology Information [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>].
  
- ◆ Bonning BC y Miller AW. 2010. Dicistroviruses. *Annual Review Entomology* 55: 129-150.
  
- ◆ Bos R. 1988. The importance of peridomestic environmental management for the control of the vectors of Chagas' disease. *Revista Argentina de Microbiología* 20: 58-62.
  
- ◆ Boyapalle S, Pal N, Miller WA y Bonning BC. 2007. A glassy-winged sharpshooter cell line supports replication of *Rhopalosiphum padi* virus (Dicistroviridae). *Journal of Invertebrate Pathology* 94: 130-139.
  
- ◆ Brener Z. 1984. Laboratory acquired Chagas' disease: an endemic disease among parasitologists?. En *Proc. Course on Genes and antigens of*

- Parasites. A laboratory Manuel Morel C (ed). UNDP/World Bank/WHO, Editora Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, pp. 3-9.
- ◆ Buxton PA. 1930. The biology of a blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Transactions of the Entomological Society of London* 78: 227-236.
  - ◆ Cabrera AL y Willink A. 1973. Biogeografía de América Latina. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Departamento de Asuntos Científicos. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Washington DC, pp. 128.
  - ◆ Canale DM, Cecere MC, Chuit R y Gürtler RE. 2000. Peridomestic distribution of *Triatoma garciabesi* and *Triatoma guasayana* in north-west Argentina. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 383-390.
  - ◆ Carcavallo RU. 1972. Life cycle of some species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Entomologist* 104: 699-704.
  - ◆ Carcavallo RU. 1985. Sinopsis epidemiológica de la enfermedad de Chagas. En Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas. Tomo I. Epidemiología y Vectores. Centro Panamericano de Ecología Humana y salud (OMS). Servicio Nacional de Chagas. Ministerio de Salud y Acción Social. Carvallo RU, Rabinovich JE y Tonn RJ (eds). Republica Argentina, pp. 19-20.
  - ◆ Carcavallo RU y Martínez A. 1985. Biología, ecología y distribución geográfica de los triatomos americanos (excepto *R. prolixus*, *P. megistus*, *T. dimidiata* y *T. infestans*). En Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas. Tomo I. Centro Panamericano de Ecología Humana y salud (OMS). Servicio Nacional de Chagas. Ministerio de Salud y Acción Social. Carvallo RU, Rabinovich JE y Tonn RJ (eds). Republica Argentina, pp.149-208.
  - ◆ Carlier Y, Pinto Dias JC, Luquetti A, Hontebeyrie-Joskowicz M, Torrico F y Truysens C. 2002. Trypanosomiasis américaine ou maladie de Chagas.

- Encycl. Med. Chir. Maladies infectieuses. 8-505-A-20, 2002, pp. 21. En Triatominos de Bolivia y la enfermedad de Chagas. Ministerio de salud y deportes. Unidad de Epidemiología. Programa Nacional de Chagas. Ministerio de Salud y Deportes. Mirko Rojas Cortes (ed). Bolivia, pp. 259-270.
- ◆ Carvajal G, Mougabure-Cueto G y Toloza AC. 2012. Toxicity of non-pyrethroid insecticides against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 107: 675-679.
- ◆ Casida JE y Quistad GB. 1995. Pyrethrum flowers, production, chemistry, toxicology, and uses. Oxford university press, Inc. Oxford.
- ◆ Ceballos LA, Piccinali RV, Berkunsky I, Kitron U y Gürtler RE. 2009. First Finding of Melanic Sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Colonies in the Argentine Chaco. *Journal of Medical Entomol* 46 (5): 1195-1202.
- ◆ Cecere MC, Castañera MB, Canale DM, Chuit R y Gürtler RE. 2003. *Tripanosoma cruzi* infection in *Triatoma infestans* and other triatomines: long-term effect of a control program in rural northwestern Argentina. *Pan American Journal Public Health* 5 (6): 392-399.
- ◆ Cecere ME, Gürtler RE, Canale D y Cohen JE. 1996. El papel del peridomicilio en la eliminación del *T. infestans* de las comunidades rurales argentinas. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 121 (1): 1-10.
- ◆ Cecere MC, Gürtler RE, Canale D, Chuit R y Cohen JE. 1997. The role of the peridomiciliary area in the elimination of *Triatoma infestans* from rural Argentine communities. *Pan American Journal Public Health* 1 (4): 273-279.
- ◆ Cecere MC, Gürtler RE, Canale DM, Chuit R y Cohen JE. 2002. Effects of partial housing improvement and insecticide spraying on the reinfestation dynamics of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Trópica* 84: 101-116.

- ◆ Cecere MC, Vazquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Gurevitz JM, Zárate JE y Zaidenberg M. 2006a. Comparative trial of the effectiveness of pyrethroid insecticides against peridomestic populations of *Triatoma infestans* in northwestern Argentina. *Journal of Medical Entomology* 43: 902-9.
- ◆ Cecere MC, Vazquez-Prokopec GM, Gürtler RE y Kitron U. 2006b. Reinfestation sources for Chagas disease vector, *Triatoma infestans*, Argentina. *Emerging Infectious Diseases* 12: 1096-1102.
- ◆ Chagas C. 1911. Nova entidade morbid do homen, resumo geral de estudos etiologicos e clínicos. *Memórias del Instituto Oswaldo Cruz* 3: 219-275.
- ◆ Christian PD y Scotti PD. 1996. Biopesticides from small RNA viruses of insects: aspects of their in vitro production. En *Invertebrate Cell Culture: Looking Toward the Twenty First Century*. Maramorosch K y Loeb MJ (eds). Proceedings of the IX International Conference on Invertebrate Cell Culture. Society for in Vitro Biology, pp. 73-81.
- ◆ Christian PD y Scotti PD. 1998. Picorna-like viruses of Insects. En *The insect viruses*. Miller LK y Ball LA (eds). Plenum Press, New York, pp. 301-336.
- ◆ Christian PD y Scotti PD. 2008. Dicistroviruses. En *Encyclopedia of Virology* (3° edición). Mahy BWJ y Vanregennmortel MHV (eds). Academic Press/Elsevier, pp. 37-44.
- ◆ Cortez MR, Azambuja P, Brasileiro C, Garcia ES y Salabert M. 2007. Fisiología de triatominos y su relación con el desarrollo de *Trypanosma cruzi*. En *Triatominos de Bolivia y la Enfermedad de Chagas*. Ministerio de salud y deportes. Unidad de Epidemiologia. Programa Nacional de Chagas. Ministerio de Salud y Deportes. Mirko Rojas Cortes (ed). Bolivia, pp. 25-44.
- ◆ Czibener C. 2003. Caracterización molecular del Virus de Triatoma (TrV). Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Gral. San Martin, pp. 94.



- ◆ Czibener C, Alvarez D, Scodeller E y Gamarnik AV. 2005. Characterization of internal ribosomal entry sites of Triatoma virus. *Journal of General Virology* 86: 2275-2280.
  
- ◆ Czibener C, La Torre JL, Muscio OA, Ugalde RA y Scodeller EA. 2000. Nucleotide sequence analysis of Triatoma virus shows that it is a member of a novel group of insect RNA viruses. *Journal of General Virology* 81: 149-1154.
  
- ◆ Daoust R. 1983. Pathogens of Reduviidae (Assassin bugs). Capítulo XIX. En *Bibliography on Pathogens of Medically Important Arthropods* 1981, vol. 83. Roberts DW, Daoust R y Wraight S (eds). World Health Organ, pp. 266-269. 1324.
  
- ◆ da Silva Valente SA, de Costa Valente V y Neto HF. 1999. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas Disease in the Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (1): 395-398.
  
- ◆ De Lana M y Tafuri WL. 2005. *Tripanosoma cruzi* e Doença de Chagas. En *Parasitología Humana* (11° edición). David Pereira Neves (ed). Atheneu, San Pablo, pp. 85.
  
- ◆ De Miranda JR, Drebot M, Tyler S, Shen M, Cameron CE, Stoltz DB y Camazine SM. 2004. Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *Journal of General Virology* 85: 2263-2270.
  
- ◆ Deniz N, Lenarcic EM, Landry DM y Thompson SR. 2009. Translation initiation factors are not required for Dicistroviridae IRES function in vivo. *RNA* 15 (5): 932-946.
  
- ◆ Días JCP. 1995. Historia natural da doença de Chagas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 65: 359-366.
  
- ◆ Diosque P, Barnabé C, Padilla AM, Marco JD, Cardozo RM, Cimino

- RO, Nasser JR, Tibayrenc M, Basombrío MA. 2003. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. *International Journal for Parasitology* 33 (10):997-1003.
- ◆ Diosque P, Padilla AM, Cimino RO, Cardozo RM, Negrette OS, Marco JD, Zacca R, Meza C, Juarez A, Rojo H, Rey R, Corrales RM, Nasser JR, Basombrío MA. 2004. Chagas disease in rural areas of Chaco Province, Argentina: epidemiologic survey in humans, reservoirs, and vectors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71 (5):590-3.
- ◆ DNAMAN Version 4.13. Lynnon Biosoft. Copyright 1994-1999.
- ◆ Dolder H y Mello MLS. 1978 a. Datos preliminares sobre partículas semelhantes a virus em células de triatomíneos. *Revista Saude Pública* 12: 104-109.
- ◆ Dolder H y Mello MLS. 1978 b. Virus like particles in the malpighian tubes of blood-sucking hemipterans. *Cellular and Molecular Biology* 23: 299-310.
- ◆ Echalié G y Ohanessian A. 1970. In vitro culture of *Drosophila melanogaster* embryonic cells. *In vitro Journal* 6:162-172.
- ◆ Eide PE. 1975. Establishment of a cell line from long-term primary embryonic house fly cell cultures. *Journal of Insect Physiology* 21:1431-1438.
- ◆ Elliot M. Chemicals in insect control. In Pyrethrum flowers, production, chemistry, toxicology, and uses, Casida, J.E. and Quistad, G.B. (eds). Oxford university press, Inc. Oxford, pp 3-31.
- ◆ Erlandson M. 2008. Insect Pest Control by Viruses. Encyclopedia of Virology (3° edición). Elsevier Ltd. Tomo 3, pp. 125–133.
- ◆ Evans H y Shapiro M. 1997. Viruses. En Manual of techniques in insect

- pathology. Capítulo VIII-1. Lacey L (ed). Academic Press, San Diego, Ca. USA, pp. 337-353.
- ◆ Fabro J, Sterkel M, Mougabure-Cueto G, Germano M, Rivera-Pomar R y Ons S. 2012. Identification of the sequence of domain II from para type sodium channel in triatomines, and the presence of a point mutation associated with pyrethroid resistance in *Triatoma infestans*. *Infection, Genetics and Evolution* 12: 487-491.
- ◆ Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U y Ball LA. 2005. Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London, pp. 1263.
- ◆ Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR y Skalka AM. 2004. Principles of Virology; Molecular Biology, Pathogenesis and Control of Animal Viruses (2° edición). ASM Press, Washington, D.C, pp. 918.
- ◆ García ES y Azambuja P. 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* in insect vector. *Parasitology* 7 (9): 240-244.
- ◆ Gascón J, Albajar P, Cañas E, Flores M, Gómez i Prat J, Herrera RN, Lafuente CA, Luciardi HL, Moncayo Á, Molina L, Muñoz J, Puente S, Sanz G, Treviño B y Sergio-Salles X. 2007. Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica. Grupo de Trabajo del II Taller “Enfermedad de Chagas importada, un nuevo reto de Salud Pública”. Documento de consenso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI). *Revista Española de Cardiología* 60 (3): 285-93.
- ◆ Germano MD, Acevedo GR, Mougabure-Cueto GA, Toloza AC, Vassena CV y Picollo MI. 2010a. New findings of insecticide resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from the Gran Chaco. *Journal of Medical Entomology* 47: 1077-1081.

- ◆ Germano MD, Vassena CV y Picollo MI. 2010b. Autosomal inheritance of deltamethrin resistance in field populations of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from Argentina. *Pest Management Science* 66: 705-708.
  
- ◆ Germano MD, Roca-Acevedo G, Santo-Orihuela P, Toloza AC, Vassena C, Picollo MI y Mougabure-Cueto G. 2012. Scientific evidence of different insecticide-resistant profiles in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina and Bolivia. *Journal of Medical Entomology* 49(6): 1355-1360.
  
- ◆ Grimaldi D y Engel MS. 2005. Evolution of the insects. Cambridge University Press, New York, USA, pp. 772.
  
- ◆ Gürtler R, Cohen JE, Cecere MC, Lauricella M, Chuit R y Segura EL. 1998. Influence of humans and domestic animal on the household prevalence of *Tripanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in northwest Argentina. *American Journal of Tropical Medicine* 6: 748-758.
  
- ◆ Hall TA. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
  
- ◆ Hayes R y Schofield C. 1990. Estimación de tasas de incidencia de infecciones y parasitosis crónica a partir de la prevalencia: la enfermedad de Chagas en América Latina. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 108: 308-16.
  
- ◆ Hertz MI y Thompson SR. 2011. Mechanism of translation initiation by Dicistroviridae IGR IRESSs. *Virology* 411: 355-361.
  
- ◆ Hoare CA y Wallace FG. 1966. Developmental stages of Tripanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature (London)* 212: 1385-1389.
  
- ◆ Hofflin JM, Sadler RH, Araujo FG, Page WE y Remington JS. 1987. Laboratory- acquired Chagas Disease. *Transactions of the Royal Society*

*of Tropical Medicine and Hygiene* 81 (3): 437-440.

- ◆ Hoshino Y, Jones RW, Ross J y Kapikian AZ. 2005. Porcine rotavirus strain Gottfried-based human rotavirus candidate vaccines: Construction and characterization. *Vaccine* 23: 3791-3799.
- ◆ Huffaker CB, Messenger PS y Debach P. 1971. The natural enemy component in natural control and the theory of biological control. Plenum Press, New York, pp. 16-67.
- ◆ Hunter WB. 2010. Medium for development of bee cell cultures (*Apis mellifera*: Hymenoptera: Apidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 46: 83-86.
- ◆ Hunter WB, Katsar CS y Chaparro JX. 2006. Molecular analysis of capsid protein of *Homalodisca coagulata* Virus-1, a new leafhopper-infecting virus from the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*. *Journal of Insect Science* 6: 1-10.
- ◆ International Committee of Taxonomy of Viruses, Index 2002, *on line*.
- ◆ Jenkins DW. 1964. Pathogens, parasites and predators of medically important arthropods. *Bulletin of the World Health Organization* 30: 92-93.
- ◆ Kieft JS. 2008. Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends in Biochemical Sciences* 33 (6): 274-283.
- ◆ Laemmli V. 1970. Cleavage and structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- ◆ Lardeux FS, Depickère S, Duchon S y Chávez T. 2010. Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia *Tropical Medicine and International Health* 15: 1037-1048.
- ◆ Lauricella MA, Stariolo RA y Riarte AR. 2005. Distribution and pathogenicity of *Tripanosoma cruzi*. Isolated from Peridomestic Populations

- of *Triatoma infestans* and *Triatoma guasayana* from Rural Western Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100 (2):123-129.
- ◆ Lent H. 1948. O genero *Rhodnius* Stal (Hemiptera Reduviidae). *Revista Brasileira de Biología* 8: 297-339.
- ◆ Lent H y Wygodzinsky P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas Diseases. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163: 123-520.
- ◆ López A, Crocco L, Morales G y Catalá S. 1999. Feeding frequency and nutritional status of peridomestic populations of *Triatoma infestans*. *Acta Trópica* 73: 275-281.
- ◆ Lorca MH. 2001. La enfermedad de Chagas congénita, transfusional y otras vías en el contexto de la interrupción de la transmisión vectorial. Grupo de Trabajo OPS en Enfermedad de Chagas, Montevideo, Uruguay, pp 1-4.
- ◆ Lynn DE y Hung ACF. 1986. Development of a continuous cell line from the insect egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera; Trichogrammatidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 22: 440-442.
- ◆ Mahy BWJ y van Regenmortel MHV. 2008. Encyclopedia of Virology. Third Edition. Tomo 3. Pp 495.
- ◆ Marti GA. 2005. Parásitos, patógenos y flora fúngica intestinal de triatominos (Hemiptera: Reduviidae) de la Argentina, con énfasis en *Triatoma infestans* (Klug). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, pp.136.
- ◆ Marti GA. 2010. Enemigos naturales de triatominos de la Argentina. Expectativas para un control integrado. En Chagas en el siglo XXI. Storino y colaboradores. Akadia, Buenos Aires, pp. 65-70.
- ◆ Marti GA, Echeverría MG, Susevich ML, Becnel JJ, Pelizza SA y García JJ. 2009. Prevalence and distribution of parasites and pathogens of

- Triatominae from Argentina, with emphasis on *Triatoma infestans* and Triatoma virus TrV. *Journal of Invertebrate Pathology* 102: 233-237.
- ◆ Marti G, González ET, Garcia JJ, Viguera AR, Guerin DMA y Echeverría MG. 2008. AC-ELISA and RT-PCR assays for the diagnosis of Triatoma virus (TrV) in triatomines (Hemiptera: Reduviidae) species. *Archives of Virology* 153 (8): 1427-32.
- ◆ Marti GA y Sanmartino M. 2008. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Guía básica para el control vectorial. Programa Federal de Chagas, pp 72.
- ◆ Masakazu T, Mitsuhashi J y Ohtaki T. 1980. Establishment of a cell line from embryonic tissues of the fleshfly, *Sarcophaga peregrina*. *Development, Growth and Differentiation* 22:11-19.
- ◆ Masoumi A, Hanzlik TN y Christian PD. 2003. Functionality of the 5' - and intergenic IRES elements of cricket paralysis virus in a range of insect cell lines, and its relationship with viral activities. *Virus Research* 94: 113-120.
- ◆ Mayo MA. 2002. Virus Taxonomy-Houston. *Archives of Virology* 147 (5): 1071-1076.
- ◆ Miller LK y Ball LA. 1998. *The insect viruses*. Plenum Press, N.Y., USA, pp. 543.
- ◆ Ministerio de Salud de la Nación. 2006. Guía para la atención del paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Programa Nacional de Chagas. Resolución Ministerial N° 1870 del 23/11/2006.
- ◆ Moore NF, Kearns A y Pullin JSK. 1980. Characterization of Cricket Paralysis Virus- Induced Polypeptides in *Drosophila* Cells. *Journal of Virology* 33 (1): 1-9.
- ◆ Muscio OA. 1988. Búsqueda de entomopatógenos y su evaluación como posibles agentes de control de *Triatoma infestans*. Tesis Doctoral,

Universidad Nacional de La Plata, pp.129.

- ◆ Muscio OA, Bonder MA, La Torre JL y Scodeller EA. 2000. Horizontal transmisión of Triatoma Virus through the fecal-oral route in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Triatomidae). *Journal of Medical Entomology* 37 (2): 271-275.
- ◆ Muscio OA, La Torre JL, Bonder MA y Scodeller EA. 1997. Triatoma virus Pathogenicity in Laboratory Colonies of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 34 (3): 253-256.
- ◆ Muscio OA, La Torre JL y Scodeller EA. 1987. Small nonoccluded viruses from triatomine bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 49: 218-220.
- ◆ Muscio OA, La Torre JL y Scodeller EA. 1988. Characterization of Triatoma virus, a picorna-like virus isolated from the triatomine bug *Triatoma infestans*. *Journal of General Virology* 69: 2929-2934.
- ◆ Naumann K. 1990. Synthetic pyrethroid insecticides: structures and properties. Springer-Verlag, Berlín, 241 pp.
- ◆ Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Abad-Franch F, Flores E y Vargas F. 2000. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94: 23-27.
- ◆ Noireau F, Flores R, Gutierrez T y Dujardin JP. 1997. Detection of wild dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 583-584.
- ◆ Noireau F, Flores R y Vargas F. 1999a. Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93: 13-14.



- 
- ◆ Noireau F, Gutierrez T, Flores R, Breniere F, Bosseno M y Wisnivesky-Colli C. 1999b. Ecogenetics of *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana* (Hemiptera: Reduviidae) in the Bolivian Chaco. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 451- 457.
  
  - ◆ OPS (Organización Panamericana de la Salud). 2006. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Montevideo; Organización Panamericana de la Salud; pp. 28. OPS. OPS/.HDM/CD/425-06.
  
  - ◆ Pal N, Boyapalle S, Beckett R, Miller WA y Bonning BC. 2007. A baculovirus-expressed dicistrovirus that is infectious to aphids. *Journal of Virology* 81 (17): 9339-45.
  
  - ◆ Panzera F, Dujardin JP, Nicolini P, Caraccio M y Rose V. 2004. Genomic changes of Chagas disease vector, South America. *Emerging Infectious Diseases* 10: 438-446.
  
  - ◆ Passmore LA, Schmeing TM, Maag D, Applefield DJ, Acker MG, Algire MA, Lorsch JR y Ramakrishnan V. 2007. The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce and open conformation of the 40S ribosome. *Molecular Cell* 26 (1): 41-50.
  
  - ◆ Peck T. 2009. The disease that's ravaging Latin America. CNN, Internet Ed. June 10. <http://edition.cnn.com/2009/HEALTH/06/10/chagas.bolivia.deadly/index.html>
  
  - ◆ Perlowagora-Szumlewicz A. 1976. Laboratory colonies of Triatominae, biology and population dynamics. Washington (DC), PAHO, pp. 63-82. (PAHO *Scientific Publication*, 318).
  
  - ◆ Perry AS, Yamamoto I, Ishaaya I y Perry RY. 1998. Insecticides in agriculture and environment. Springer-Verlag, Berlin.

- 
- ◆ Pessoa y Martins. 1977. *Tripanosoma cruzi* e molestia de Chagas. En Parasitologia Médica (10° edición). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, pp: 143-191.
  - ◆ Picollo MI, Vassena C, Santo Orihuela P, Barrios S, Zaidenberg M y Zerba E. 2005. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *Journal of Medical Entomology* 42: 637-42.
  - ◆ Porcasi X, Catala SS, Hrellac H, Scavuzzo MC y Gorla DE. 2006. Infestation of rural houses by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in southern area of Gran Chaco in Argentina. *Journal of Medical Entomology* 43: 1060-1067.
  - ◆ Prata A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases* 1 (2): 92-100.
  - ◆ Rabinovich JE. 1972. Population dynamics of *Telenomus fariai* (Hymenoptera: Scelionidae), a parasite of Chagas' disease vectors. *Acta Científica Venezolana* 23: 79-83.
  - ◆ Rabinovich J. 1973. Informe inédito de la Reunión de Planificación de la Unidad para el estudio de los vectores de la enfermedad de Chagas, OMS, Maracay-Acarigua, Venezuela.
  - ◆ Ranson H, Claudianos C, Ortellí F, Abgrall C y Hemingway J. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298: 179-181.
  - ◆ Rassi A Jr, Rassi A y Marin-Neto JA. 2010. Chagas Disease. *The Lancet* 375: 1388-402.
  - ◆ Roberts DW. 1980. XIX. Pathogens of Reduviidae (Assassin bugs). En Bibliography on pathogens of medically important arthropods. Roberts DW y Castillo JM (eds). *World Health Organ* 58: 1-197.

- ◆ Roberts DW y Strand MA. 1977. Pathogens of medically important arthropods. *World Health Organ* 55: 1-243.
- ◆ Roberts LO y Groppelli E. 2009. An atypical IRES within the 5'UTR of a dicistrovirus genome. *Virus Research* 139: 157-165.
- ◆ Rodrigues Coura J, Veríssimo Junqueira AC, de Carvalho Moreira CJ, Borges Pereira J y Albajar Viñas P. 2007. Uma visao sistêmica da endemia chagastica. En La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. OPS-Fundación Mundo Sano, publicación monográfica 7. Washington DC-Buenos Aires, pp. 25-37.
- ◆ Rolón M, Veja MC, Roman F, Gómez A y Rojas de Arias A. 2011. First Report of Colonies of Sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in the Paraguayan Chaco, Using a Trained Dog. *Neglected Tropical Diseases* 5 (5): 1-7.
- ◆ Rozas Dennis GS. 2007. Estudios biológicos y estructurales del virus TrV, patógeno de vinchucas (Heteroptera, Reduviidae). Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, pp. 159.
- ◆ Rozas-Dennis GS y Cazzaniga NJ. 2000. Effect of Triatoma Virus (TrV) on fecundity and moulting in Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 94: 633-641
- ◆ Rozas-Dennis GS, Cazzaniga NJ y Guérin DM. 2002. *Triatoma patagonica* (Hemiptera, Reduviidae), a New Host for Triatoma virus *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (3): 427-429
- ◆ Rozas Dennis GS, La Torre JL, Muscio OA y Guerin DMA. 2000. Direct methods for detecting Picorna-like Virus from dead and alive Triatomine Insects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95 (3): 323-327.
- ◆ Ryckman RE y Blankenship CM. 1984. The parasites, predators and symbionts of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Bulletin of the Society for Vector Ecology* 9 (2): 84-111.

- ◆ Sambrook J, Frittsch EF y Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual (2° edición). Cold Spring Harbor Lab Press, New York, pp. 1307.
  
- ◆ Santo Orihuela PL, Vassena CV, Zerba EN y Picollo MI. 2008. Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *Journal of Medical Entomology* 45: 298-306.
  
- ◆ Schneider I. 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 27: 353-365.
  
- ◆ Schuler M, Connell SR, Lescoute A, Giesebrecht J, Dabrowski M, Schroeer B, Mielke T, Penczek PA, Westhof E, Spahn CM. 2006. Structure of the ribosome-bound cricket parálisis virus IRES RNA. *Nature Structural & Molecular Biology* 13: 1092-1096.
  
- ◆ Scotti PD, Hoefakker P y Dearing S. 1996. The Production of Cricket Paralysis Virus in Suspension Cultures of Insect Cell Lines. *Journal of Invertebrate Pathology* 68: 109-112.
  
- ◆ Segura EL, Sosa ES, Esquivel ML, Gómez AO, Salomón OD. 1999. Control de la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en la Argentina 1999. *Medicina* 59 (2): 91-96.
  
- ◆ Segura EL, Sosa ES, Esquivel ML, Salomón OD, Cura EN, Gómez AO, De Rissio AM, Carlomagno MA, Riarte A, Sinagra A, Luna A, Lansetti JC y Chuit R. 2001. Control de la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en la Argentina, 2001. Actual. Artrop. Sanit. Argent. RAVE. Serie Enfermedades Transmisibles. Monografía 2, pp: 273-282.
  
- ◆ Sohi SS y Ennis TJ. 1981. Chromosomal characterization of cell lines of *Neodiprion lecontei* (Hymenoptera; diprionidae). *Proceedings of the Entomological Society of Ontario* 112: 45-48.

- ◆ Storino R y Milei J. 1986. Miocardiopatía Chagásica crónica: un enfoque para el Clínico general. Ed. Club de Estudio. Buenos Aires, 2, pp. 11-21.
- ◆ Storino R y Milei J. 1994. Introducción. Enfermedad de Chagas. Mosby-Doyma, Argentina, Buenos Aires, Cap. 1:1-7.
- ◆ Storino R. 2001. Enfermedad de Chagas. Cap. 59: 574-585. En Mautner B. Cardiología, basado en la evidencia y experiencia de la Fundación Favaloro. Ed. Grupo Guía.
- ◆ Storino R, Jorg M y Auger S. 2003. Atención medica del paciente chagásico. Manual práctico. Un enfoque biológico, antropológico y social. Ediprof, Buenos Aires, Cap. 1:11-15.
- ◆ Storino AR. 2010. Chagas en el siglo XXI. Ed. Akadia. Buenos Aires. Pp. 293.
- ◆ Sztajzel J, Cox J, Pache JC, Badaoui E, Lerch R y Rutishauser W. 1996. Chagas' disease may also be encountered in Europe. *European Heart Journal* 17: 1289.
- ◆ Tamura K, Dudley J, Nei M y Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetic analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- ◆ Tapaszti Z, Forgárch P, Kovago C, Topolska G, Nowotny N, Rusvai M y Bakonyi T. 2009. Genetic analysis and phylogenetic comparison of Black queen cell virus genotypes. *Veterinary Microbiology* 139: 227-234.
- ◆ Teixeira AR, Nascimento RJ y Sturm NR. 2006. Evolution and pathology in Chagas disease – A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 463-491.
- ◆ Toloza AC, Germano M, Cueto GM, Vassena C, Zerba E y Picollo MI. 2008.

- Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *Journal of Medical Entomology* 45: 421-426.
- ◆ Turienzo P y Di Iorio O. 2007. Insects found in birds' nests from Argentina. Part I: a bibliographical review, with taxonomical corrections, comments and a hypothetical mechanism of transmission of cimicid bugs. *Zootaxa* 1561: 1-52.
- ◆ Ueno Y, Nakamura Y, Inoue T, Endo S, Kinoshita M y Takeuchi T. 1995. A highly suspected case of chronic Chagas' heart disease diagnosed in Japan. *Japanese Circulation Journal* 59: 219-23.
- ◆ van Regenmortel M. 2000. Introduction to the species concept in virus taxonomy. En *Virus Taxonomy of Viruses*. van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR y Wickner RB (eds). Seventh ICTV Report. Academic Press, New York San Diego, pp. 3-16.
- ◆ Vassena CV, Picollo MI y Zerba EN. 2000. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Medical and Veterinary Entomology* 14 (1): 51-55.
- ◆ Wahrman MZ y Zhu S. 1993. Haploid and diploid cell cultures from a haplo-diploid insect. *Invertebrate Reproduction and Development* 24: 79-86.
- ◆ Waleckx E, Depickère S, Salas R, Aliaga C, Monje M, Calle H, Buitrago R, Noireau F y Brenière SF. 2012. New Discoveries of Sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) throughout the Bolivian Chaco. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 86 (3): 455-8.
- ◆ Weiser J. 1991. Biological Control of Vectors. Manual for collecting, field determination and handling of biofactors for control of vectors. John Wiley y Sons Chichester, U.K, pp. 1-189.
- ◆ Wiggelesworth VB. 1972. The Principles of Insect Physiology (7° edición).

Chapman and Hall, London, pp. 827.

- ◆ Wisnivesky-Colli C, Ruiz A, Ledesma O, Gürtler R, Lauricella M, Salomon D, Solarz N y Flo J. 1993. Dispersive flight and house invasion by *Triatoma guasayana* and *Triatoma sordida* in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88: 27-31.
- ◆ Wisnivesky-Colli C, Schweigmann NJ, Pietrokovsky SM, Bottazzi V y Rabinovich JE. 1997. Spatial distribution of *Triatoma guasayana* (Hemiptera, Reduviidae) in hardwood forest biotopes in Santiago del Estero, Argentina. *Journal of Medical Entomology* 34: 102-109.
- ◆ World Health Organization. 2005. Report of the Scientific Working Group on Chagas Disease. Buenos Aires, Argentina. 17-20. [http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/swg\\_chagas.pdf](http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/swg_chagas.pdf).
- ◆ World Health Organization. 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases.
- ◆ World Health Organization. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). 6/ 2010. Nota descriptiva N°340.
- ◆ Yasutaka H, Ronald WJ, Jerri R y Albert ZK. 2005. Porcine rotavirus strain Gottfried-based human rotavirus candidate vaccines: Construction and characterization. *Vaccine* 23: 3791-3799.
- ◆ Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, López E, González N, Patterson JS y Gaunt MW. 2005. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International Journal of Parasitology* 35: 225-233.
- ◆ Zeledon R y Rabinovich J. 1981. Chagas' Disease and ecological appraisal whit special emphasis on its insect vectors. *Annual Review Entomology* 26: 101-133.

- ◆ Zerba EN. 1999. Susceptibility and resistance to insecticides of chagas disease vectors. *Medicina* 59 (2): 41-46.